

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THIAGO ESTEFANO RODRIGUES

REGULAÇÃO DA ACETIL-CoA CARBOXILASE PELAS PROTEÍNAS PII E
CRISTALIZAÇÃO DA ENZIMA GlnD DE *Escherichia coli*

CURITIBA

2018

THIAGO ESTEFANO RODRIGUES

REGULAÇÃO DA ACETIL-COA CARBOXILASE PELAS PROTEÍNAS PII E
CRISTALIZAÇÃO DA ENZIMA GlnD DE *Escherichia coli*

Tese de doutorado apresentado ao curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em bioquímica.

Orientador: Dr. Luciano Fernandes Huergo

Orientador no exterior: Dr. Liang Tong

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Rodrigues, Thiago Estefano

Regulação da acetil-CoA carboxilase pelas proteínas PII e cristalização da enzima GlnD de *Escherichia coli*. / Thiago Estefano Rodrigues. – Curitiba, 2018.

144 p.: il. ; 30cm.

Orientador: Luciano Fernandes Huergo

Orientador no exterior: Liang Tong

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

1. Proteínas. 2. Ácidos graxos. 3. Acetil-CoA Carboxilase. 4. Enzimas.
Título. II. Huergo, Luciano Fernandes. III. Tong, Liang. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

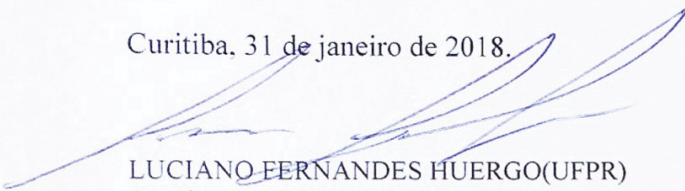
CDD (20. ed.) 574.1925

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Tese de Doutorado de THIAGO ESTEFANO RODRIGUES, intitulada: REGULAÇÃO DA ACETILCOA CARBOXILASE PELAS PROTEÍNAS PII E CRISTALIZAÇÃO DA ENZIMA GlnD DE *Escherichia coli*, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APPROVED no rito de defesa.

A outorga do título de Doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 31 de janeiro de 2018.



LUCIANO FERNANDES HUERGO(UFPR)
(Presidente da Banca Examinadora)



MARCO AURELIO S. DE OLIVEIRA(UEM)



ANA CLAUDIA BONATTO(UFPR)



EMANUEL MALTEMPI DE SOUZA(UFPR)

BEATRIZ GOMES GUIMARAES(UFPR)



AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pois nele me fortaleço e tive forças para levantar todas as vezes que caí durante essa jornada acadêmica e durante toda a minha vida, e nele tive forças para seguir em frente sempre de forma leve, serena e feliz.

Agradeço à minha mãe que me ajudou e me deu suporte em todo momento de necessidade. Amo muito. Agradeço também a toda minha família, especialmente a minha madrinha Carolina pelo amor de sempre.

Quero agradecer ao meu orientador, o professor Dr. Luciano Huergo, pela dedicação. Já estamos trabalhando juntos desde 2010 e desde então foi sempre um aprendizado para mim, não só profissional, mas também, para a vida. Tenho orgulho de ter sido seu orientado.

Agradeço ao professor Dr. Liang Tong pela oportunidade de trabalhar na sua super qualificada equipe e por ter me dado suporte financeiro e intelectual. Foi realmente muito enriquecedor na minha vida ter feito parte do Tong Lab na Columbia University – NY. Agradeço ao Department of Biological Sciences da Columbia University por toda a estrutura e suporte fornecido, pelo retiro mais maravilhoso do mundo e pelas cervejas importadas das sextas-feiras. Aproveito para agradecer também aos integrantes do Tong Lab, especialmente ao Dr. Philip Choi e ao Dr. Timothy Tran pela ajuda nas cristalografia de proteína da vida e pela amizade. Agradeço também ao Dr. Wei Shen Aik pela amizade, conselhos, conversas e cervejas. Devo também meus super agradecimentos a Yinglu Zhang pela amizade, pelas ajudas e pelo cheese cake da minha despedida. Agradeço ao Dr. Shukun Luo pela amizade, animação do dia-a-dia e pela xícara de chá chinês de mil dólares. E claro, agradeço ao meu parceiro de fotografia, o inglês mais sulamericano que conheci, Dr. Ryaz Maderbocus.

Quero agradecer também aos meus amigos do brasilzão, aos de longa data e aos recentes, aos das alegrias e aos das tristezas, à galera do futebol e da zoeira que fizeram parte de tudo isso.

Agradeço à colaboração da Dra. Edileusa Gerhardt e a todos aqueles que estão e aos que passaram pelo nosso lab na 271/272. Agradeço ao professor Dr. Glaucio Valdameri pela ajuda com o citômetro de fluxo, ao professor Dr. Marco Aurélio de Oliveira pela ajuda com o ITC, não deu certo mas valeu. Agradeço ao laboratório multiusuário de microscopia da UFPR pelos experimentos no *scanner* de lâmina. Agradeço aos técnicos do departamento pelos seus serviços e aos professores Dr. Emanuel de Souza e Dr. Fabio Pedrosa por tornarem tudo possível.

Meus agradecimentos aos professores Dr. Jaime Pava e Dra. Elaine Benelli pela correção desta tese e do projeto e relatórios.

Honrosamente agradeço aos professores que aceitaram ser banca examinadora da minha defesa de tese de doutorado, Dr. Emanuel de Souza, Dra. Ana Claudia Bonatto, Dr. Marco Aurélio de Oliveira e Dra. Beatriz Guimarães.

Agradeço ao CNPq pela bolsa de doutorado, inclusive para o período sanduíche.

Agradeço à pós-graduação em Ciências Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, por ser essa pós mais top da federal inteira. Agradeço à Universidade Federal do Paraná por me receber a 10 anos atrás e me trazer até aqui com uma formação de qualidade.

Agradeço à Pati pelo carinho e amor.

RESUMO

As proteínas PII constituem uma das mais amplamente distribuídas famílias de proteínas transdutoras de sinais, encontradas em Bacteria, archaeas fixadoras de nitrogênio e cloroplastos de eucariotos fototróficos (algas vermelhas e plantas). Em *E. coli*, há dois representantes da família de proteínas PII, GlnB e GlnK. Essas proteínas atuam por meio da interação proteína-proteína, regulando alvos de acordo com flutuações dos níveis de moléculas sinalizadoras do status de nitrogênio, carbono e energia. Assim, as proteínas PII são tidas como integradoras dos metabolismos de nitrogênio, carbono e energia. Recentes estudos mostraram a interação de PII com BCCP, subunidade da enzima acetil-CoA carboxilase (ACC), de forma dependente de ATP e negativamente regulada por 2-oxoglutarato (2-OG). A enzima ACC de *E. coli* é composta pelas subunidades BCCP, BC e CT que catalisam a formação de malonil-CoA a partir de acetil-CoA, sendo esta a primeira e irreversível etapa da biossíntese de ácidos graxos. Neste trabalho, foram obtidos resultados mostrando a formação de complexo ternário entre as proteínas PII, BCCP e BC e o efeito inibitório *in vitro* desta interação na atividade da ACC em *E. coli*. Além disso, os resultados aqui apresentados sugerem que estirpes de *E. coli* mutantes PII apresentam maior produção de ácidos graxos do que as células selvagens, quando sob super-expressão de uma tioesterase (TesA). Também, é mostrado neste trabalho que os níveis de malonil-CoA são diminuídos sob super-expressão de GlnB, sugerindo que as proteínas PII exercem efeito inibitório na atividade de ACC *in vivo* e que, assim, são funcionalmente importantes no ajuste fino na síntese de ácidos graxos de acordo com os sinais de carbono, nitrogênio e energia. Estes dados podem potencialmente contribuir para a otimização da produção microbiana de biocombustíveis por meio da engenharia genética em *E. coli*. Além disso, foram determinadas as condições de purificação e cristalização da enzima GlnD de *E. coli*. Neste organismo, GlnD catalisa a uridililação/desuridililação de PII de acordo com os níveis de glutamina, direcionando as proteínas PII a interagir com alvos específicos em resposta a este metabólito.

Palavras-chave: proteínas PII, metabolismo de nitrogênio, metabolismo de carbono, ácidos graxos, acetil-CoA carboxilase, GlnD

ABSTRACT

PII proteins are one of the most widespread family of signal transduction proteins, found in Bacteria, nitrogen-fixing Archaea and in the chloroplasts of eukaryotic phototrophs (red algae and plants). In *E. coli*, there are two representatives of the PII family, GlnB and GlnK. These proteins act by protein-protein interaction with target proteins. These interactions are determined according to the level of nitrogen, carbon and energy signaling molecules. Hence PII are considered as a control integrating module between the nitrogen, carbon and energy metabolisms. Recently, the interaction between PII and BCCP was shown. BCCP is a subunit of the acetyl-CoA carboxylase (ACC) enzyme and the interaction between PII and BCCP is ATP-dependent and negative regulated by 2-oxoglutarate (2-OG). *E. coli* ACC is a multi-subunit enzyme formed by BCCP, BC and CT subunits. ACC catalyze the first and committed step in fatty acid biosynthesis, the formation of malonyl-CoA from acetyl-CoA. In this work, we show the formation of a ternary complex between PII, BCCP and BC *in vitro* and the inhibitory effect of this interaction on the ACC activity in *E. coli*. In addition, we show that PII mutants strains have increased fatty acid productivity in comparison to *E. coli* wild-type, under TesA overexpression. Also, in this work it was observed that GlnB overexpression decreases the levels of malonyl-CoA when ACC was overexpressed in *E. coli*. Collectively these results indicate the inhibitory effect of PII over ACC activity *in vivo*. These data provide the basis to increase microbial biofuels production by genetic engineered *E. coli*. Here we also show the preliminary purification and crystallization condition of the *E. coli* GlnD enzyme. The GlnD enzyme uridylylates/deuridylylates PII proteins in response to glutamine levels, thereby controlling the interaction between PII proteins and specific targets.

Keywords: PII proteins, nitrogen metabolism, carbon metabolism, fatty acids, acetyl-CoA carboxylase, GlnD

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1 – Sistema GS/GOGAT (A) e sistema Ntr (B) em <i>E. coli</i>	15
FIGURA 2 – Controle do sistema Ntr pela GlnB.....	17
FIGURA 3 – Estrutura geral das proteínas PII e Análise de sequência de aminoácidos das proteínas PII.....	20
FIGURA 4 – Modificações na estrutura das proteínas PII.....	21
FIGURA 5 – Esquema representativo da organização dos domínios da enzima GlnD de <i>E. coli</i>	23
FIGURA 6 – Estrutura geral dos domínios NT da ATase de <i>E. coli</i>	25
FIGURA 7 – Arranjo estrutural conservado do domínio ACT.....	26
FIGURA 8 – Estrutura geral do complexo AmtB-GlnK de <i>E. coli</i>	34
FIGURA 9 – Estrutura geral do complexo AmtB-GlnK de <i>E. coli</i>	31
FIGURA 10 – Esquema da reação catalisada por enzimas carboxilases dependentes de biotina e Organização dos domínios de enzimas ACC em diversos organismos.....	34
FIGURA 11 – Estrutura geral da biotina carboxilase (BC).....	37
FIGURA 12 – Sítio ativo da biotina carboxilase (BC) de <i>E. coli</i>	37
FIGURA 13 – Estrutura da porção C-terminal da BCCP de <i>E. coli</i> e Análise de sequência de aminoácidos de BCCP.....	40
FIGURA 14 – Comparação estrutural dos domínios biotinoil da BCCP humana e de <i>E. coli</i>	43
FIGURA 15 – Estrutura da carboxiltransferase (CT).....	45
FIGURA 16 – Estrutura da ACC de <i>S. cerevisiae</i>	48
FIGURA 17 – Regulação da ACC de <i>E. coli</i>	50
FIGURA 18 – Biossíntese e degradação de lipídeos em <i>E. coli</i>	55
TABELA 1 – Células e plasmídeos.....	60
FIGURA 19 – Interação entre GlnB e complexo BC-BCCP.....	73
FIGURA 20 – 2-OG desfavorece a formação do complexo ternário GlnB-BCCP-BC de forma dose dependente em <i>E. coli</i>	74
FIGURA 21 – GlnB-UMP ₃ não interage com o complexo BCCP-BC.....	75
FIGURA 22 – Interação entre as proteínas PII de <i>A. brasilense</i> e BCCP-BC de <i>E. coli</i>	76
FIGURA 23 – Interação entre GlnK e o complexo BCCP-BC.....	77
FIGURA 24 – Atividade da acetil-CoA carboxilase (ACC) na presença de GlnK e GlnB de <i>E. coli</i>	77
FIGURA 25 – Quantificação de ácidos graxos em estirpes de <i>E. coli</i> mutantes PII sob super-expressão de TesA.....	80
FIGURA 26 – Produtividade específica de ácidos graxos em estirpes de <i>E. coli</i> mutantes PII.....	81
FIGURA 27 – Efeito da ausência de GlnB, GlnB e GlnK e da presença de TesA no tamanho de <i>E. coli</i>	83
FIGURA 28 – Produção celular de malonil-CoA na presença de GlnB.....	87
FIGURA 29 – Perfil cromatográfico da holo-BCCP de <i>E. coli</i> em gel filtração.....	89
FIGURA 30 – Formação do complexo BCCP-GlnB de <i>E. coli</i> em gel filtração.....	90
FIGURA 31 – Formação do complexo BC-BCCP-GlnB de <i>E. coli</i> em gel filtração.....	92
FIGURA 32 – Proteólise limitada da BCCP de <i>E. coli</i>	93
FIGURA 33 – Ensaio de <i>pull down</i> entre BCCP digerida por proteólise limitada e proteínas PII de <i>E. coli</i>	94
TABELA 2 - Parâmetros analisados para cálculo de probabilidade de cristalização de BCCP.....	98
FIGURA 34 – Primeira etapa de purificação da GlnD de <i>E. coli</i>	99
FIGURA 35 – Perfil cromatográfico da enzima GlnD.....	102
FIGURA 36 – Gel de eletroforese Native-PAGE com amostras de GlnB uridilada por GlnD.....	103
FIGURA 37 – Cristal de GlnD e Padrão de difração do cristal	103
TABELA 3 – Parâmetros analisados para cálculo de probabilidade de cristalização de GlnD.....	104
TABELA 4 – Dados do cristal. Difração no síncrotron APS Chicago-US.....	104

Figura complementar 1 – Análise de sequência de aminoácidos de GlnD de <i>E. coli</i>	127
Figura complementar 2 – Sequencia da GlnD de <i>E. coli</i> e predição de estrutura secundária.....	128
Figura complementar 3 – Sequencia da BCCP de <i>E. coli</i> e predição de estrutura secundária.....	128
Figura complementar 4 – Efeito da taxa ATP/ADP na interação HisGlnB-BCCP-BC em <i>E. coli</i> ..	129
Tabela complementar 1 – Composições do kit PEG/Íon (Hampton Research).....	130

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	12
2 – REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 – ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO.....	14
2.2 – PROTEÍNAS DA FAMÍLIA PII.....	17
2.2.1 – Características das proteínas PII.....	17
2.2.2 – Estrutura das proteínas PII e sua regulação alostérica.....	18
2.2.3 – Enzima GlnD bifuncional – Uridililação/desuridililação das proteínas PII.....	22
2.2.4 – Interações PII/proteínas alvo.....	28
2.2.4.1 – Interação GlnK-AmtB.....	29
2.2.4.2 – Interação GlnB-ATase.....	30
2.2.4.3 – Outras interações PII/proteínas-alvo.....	32
2.3 – ACETIL-CoA CARBOXILASE (ACC).....	33
2.3.1 – Características estruturais dos componentes da acetil-CoA carboxilase (ACC).....	36
2.3.1.1 – Biotina carboxilase (BC).....	36
2.3.1.2 – Proteína carreadora de carboxil-biotina (BCCP).....	39
2.3.1.3 – Carboxiltransferase (CT).....	44
2.3.1.4 – Acetil-CoA carboxilase (ACC) de <i>S. cerevisiae</i>	46
2.4 – REGULAÇÃO DA ACETIL-CoA CARBOXILASE (ACC).....	49
2.5 – METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS EM BACTÉRIA.....	54
3 – OBJETIVOS.....	59
3.1 – OBJETIVO GERAL.....	59
3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	59
3.3 – FLUXOGRAMA METODOLÓGICO.....	59
4 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	60
4.1 – CÉLULAS, PLASMÍDEOS E MEIOS DE CULTIVO.....	60
4.2 – PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS.....	61
4.3 – AMPLIFICAÇÃO, RESTRIÇÃO, LIGAÇÃO DE DNA E TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA.....	61
4.4 – ELETROFORESE DE DNA.....	61
4.5 – DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	62
4.6 – ELETROFORESE DE PROTEÍNAS.....	62
4.7 – CLONAGEM E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	62
4.7.1 – Proteínas sem cauda de afinidade.....	62
4.7.2 – Proteínas com cauda de histidina (His).....	63
4.8 – PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA ENSAIOS DE CRISTALIZAÇÃO.....	64
4.8.1 – Gel filtração.....	64
4.8.2 – Purificação do complexo BC-BCCP-PII.....	64
4.8.3 – Purificação de GlnD.....	64
4.9 – BIOTINILAÇÃO.....	65
3.9.1- Gel <i>shift</i>	65
4.10 – PROTEÓLISE LIMITADA DE BCCP.....	65
4.11 – ENSAIO DE INTERAÇÃO – <i>PULL DOWN</i>	65
4.12 – ENSAIO DE ATIVIDADE DA ACC <i>IN VITRO</i>	66
4.12.1 – LC/MS.....	66
4.13 – SCANNER DE LÂMINA.....	67
4.14 – PESO SECO.....	67
4.15 – ANÁLISE E ÁCIDOS GRAXOS GC/MS.....	67
4.15.1- Células e cultivo.....	67
4.15.2 – Extração e processamento de ácidos graxos.....	68

4.15.3 – GC/MS.....	68
4.16 – ANÁLISE DA FORMAÇÃO <i>IN VIVO</i> DE MALONIL-CoA SOB SUPER-EXPRESSÃO DE GlnB.....	68
4.16.1 – Células e cultivo.....	68
4.16.2 – Extração de metabólitos.....	69
4.17 – CITOMETRIA DE FLUXO.....	69
4.18 – WESTERN BLOT.....	69
4.19 – ENSAIO DE URIDILILAÇÃO.....	70
4.20 – CRISTALIZAÇÃO DE GlnD.....	70
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
5.1 – INTERAÇÃO GlnB-BCCP-BC <i>IN VITRO</i>	72
5.2 – IDENTIFICAÇÃO DE FENÓTIPO RESULTANTE DA INTERAÇÃO GlnB-BCCP-BC.....	78
5.2.1 – Quantificação de ácidos graxos em células mutantes PII.....	78
5.2.2- Análise do tamanho de <i>E. coli</i> mutante PII.....	83
5.3 – ESTUDOS ESTRUTURAIS.....	89
5.3.1 – Purificação do complexo PII-BCCP.....	89
5.3.2 – Cristalização da enzima GlnD de <i>E. coli</i>	98
6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	106
7 – CONCLUSÕES.....	109
REFERÊNCIAS.....	110
ANEXO 1 – DADOS COMPLEMENTARES.....	126
ANEXO 2 – ARTIGO PUBLICADO.....	133

1 INTRODUÇÃO

Para sobreviver perante mudanças ambientais, bactérias precisam ser aptas a perceber eficientemente as variações na disponibilidade de nutrientes e adaptar seu metabolismo de acordo. As respostas metabólicas nutricionais precisam ocorrer de forma coordenada, integrando informações providas de diferentes ramos do metabolismo da célula. A disponibilidade de moléculas fontes de nitrogênio, de carbono e energia precisam ser precisamente percebidas para gerar respostas interconectadas com a expressão de genes específicos, com a síntese de proteínas, com a taxa de crescimento celular, entre outras funções (Commichau *et al.*, 2006).

As proteínas PII são proteínas transdutoras de sinais e seu papel é o de integração entre o metabolismo de nitrogênio, carbono e energia. Essas proteínas atuam transduzindo os sinais de variação dos níveis de 2-oxoglutarato, de ATP/ADP e glutamina. A concentração de 2-oxoglutarato é sinalizadora dos níveis de carbono e de nitrogênio (Reyes-Ramirez *et al.*, 2001; Schumacher *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013) e a taxa de ATP/ADP sinaliza os níveis de energia. Essas três moléculas, 2-oxoglutarato, ATP e ADP são reguladores alostéricos das proteínas PII, modulando sua conformação e direcionando essas proteínas a interagir com diversas proteínas, como enzimas, proteínas de membrana e fatores de transcrição (Truan *et al.*, 2010; Rajandran *et al.*, 2011; Jiang & Ninfa, 1998; Jiang & Ninfa, 2007; Fokina *et al.*, 2010). A glutamina, por sua vez, é molécula sinalizadora dos níveis de nitrogênio e suas flutuações são percebidas por uma enzima bifuncional denominada GlnD (Engleman & Francis, 1978; Jiang, Peliska & Ninfa, 1998). Em *Escherichia coli*, a enzima GlnD catalisa a adição/remoção de grupamento UMP (uridilil) às proteínas PII. Esta modificação covalente ocorre de acordo com os níveis de glutamina, de tal forma que, quando há baixa disponibilidade de glutamina, GlnD catalisa a uridililação/desuridililação de PII, por sua vez, quando há alta disponibilidade de glutamina, GlnD desuridilila PII (Engleman & Francis, 1978; Jiang, Peliska & Ninfa, 1998; Bonatto *et al.*, 2007; Araújo *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2008). Desta forma, as proteínas PII são direcionadas a interagir com alvos específicos, transmitindo os sinais da flutuação da disponibilidade de carbono, nitrogênio e energia (Huergo, Chandran & Merrick, 2012).

As proteínas PII são proteínas bastante conservadas encontradas em Bacteria, Archaeas fixadoras de nitrogênio e cloroplastos de eucariotos fototróficos (algas vermelhas e plantas) (Forchhammer, 2008). As proteínas PII de *E. coli*, GlnK e GlnB, são as proteínas PII mais bem estudadas e possuem estrutura atômica conhecida (Xu *et al.*, 1998; Cheah *et al.*, 1994; Carr *et al.*, 1996). O estudo das proteínas PII, as quais possuem ampla e ainda não totalmente conhecida gama funcional, se faz muito importante pois tais proteínas são chave na integração metabólica. Em plantas, o metabolismo de nitrogênio ocorre de forma integrada com a fotossíntese, com a fotorrespiração e a respiração. A síntese de ácidos orgânicos, amido e sacarose é afetada pelo metabolismo de carbono e

disponibilidade de nitrogênio. Assim, as proteínas PII, sendo proteínas com atuação na integração de processos metabólicos de carbono, nitrogênio e energia, tem sido alvo de estudos visando a otimização da produção agrícola (Vincentz *et al.*, 1993; Kaiser & Huber, 1994; Stitt *et al.*, 2002; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010; Nunes-Nesi, Fernie & Stitt, 2010).

As proteínas alvo de PII mais amplamente descritas são proteínas relacionadas ao metabolismo de nitrogênio (Huergo, Chandra & Merrick, 2012). Contudo, este trabalho foi principalmente dedicado ao estudo da interação entre as proteínas PII de *E. coli* com uma proteína exclusivamente engajada no metabolismo de carbono, a enzima acetil-CoA carboxilase (Rodrigues *et al.*, 2014; Feria Bourrellier *et al.*, 2010). Acetil-CoA carboxilase é uma enzima amplamente distribuída na natureza, presente em bactérias, archaeas, algas, fungos, plantas e animais, catalisando a primeira e irreversível etapa da síntese de ácidos graxos, uma das vias metabólicas mais fundamentais encontradas nos seres vivos, realizando a formação de malonil-CoA a partir de acetil-CoA (Waldrop & Cronan, 2002).

Estudos envolvendo a acetil-CoA carboxilase possuem relevante importância para a medicina, pois esta enzima tem sido relacionada a diversas doenças humanas, infecções bacterianas, infecções por fungos, diabetes, câncer, arteriosclerose e outras (Cronan & Waldrop, 2002; Tong, 2005; Campbell & Cronan, 2001; Walkil & Abu-Elheiga, 2009; Tong, 2013). Além disso, a acetil-CoA carboxilase, sendo a enzima que catalisa a etapa limitante da síntese de ácidos graxos, é alvo de diversos estudos que objetivam a otimização da produção desses compostos, pois os ácidos graxos podem ser utilizados com diversas aplicações, como para a produção de cosméticos, fármacos e biocombustíveis. A produção de biodiesel e gasolina tem sido relatada a partir de modificação química/enzimática de ácidos graxos super-produzidos em *E. coli* por meio da engenharia genética, no entanto, a produção de ácidos graxos precisa ainda ser otimizada para viabilizar a produção a nível de mercado, para possibilitar a disponibilização de energia de forma renovável e compatível com os motores baseados em hidrocarbonetos predominantemente utilizados atualmente (Lennen & Pflieger, 2012; Janßen & Steinbuchel, 2014; Howards *et al.*, 2013).

Neste contexto, sendo a acetil-CoA carboxilase descrita como alvo das proteínas PII em Bactéria (Rodrigues *et al.*, 2014) e em plantas (Feria Bourrellier *et al.*, 2010), a caracterização desta função contribui para o entendimento da regulação de uma via crucial do metabolismo de carbono, a síntese de ácidos graxos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO

As bactérias podem utilizar diversos compostos como fonte de nitrogênio celular, como o dinitrogênio, nitrato, aminoácidos e nucleotídeos. A assimilação de nitrogênio pode ocorrer por meio de vias assimilatórias e por meio de vias biossintéticas e tais vias são coordenadas por enzimas engajadas no metabolismo de nitrogênio (Merrick & Edwards, 1995). Organismos que não são capazes de assimilar dinitrogênio diretamente da atmosfera, como fazem organismos diazotrofos, apenas incorporam nitrogênio (preferencialmente na forma de amônia) diretamente do ambiente posteriormente reduzido a amônio (Reitzer, 2003; Canfield *et al.*, 2010). A absorção de amônia pode ocorrer de forma passiva pela membrana ou por meio de proteína de transporte, a AmtB, encontrada em todos os domínios da vida (van Heeswijk, Westerhoff & Boogerd, 2013).

Em enterobactérias, a assimilação de nitrogênio ocorre por meio do sistema GS/GOGAT (Figura 1), em que sob condições de alta disponibilidade de amônio extracelular, este é absorvido por AmtB, então a forma desprotonada NH_3 (amônia) é condensada ao glutamato pela ação catalítica da glutamina sintetase (GS), para formação de glutamina. A enzima glutamato sintase (GOGAT) recicla o sistema pela formação de duas moléculas de glutamato, consumindo uma de glutamina e outra de 2-oxoglutarato (2-OG). Uma vez que a assimilação de nitrogênio ocorre pela incorporação de amônia ao glutamato, formando glutamina, os níveis de glutamina são indicadores diretos da disponibilidade de nitrogênio intracelular. Por sua vez, uma vez que para a formação de glutamina é necessária disponibilidade de glutamato e que para a formação de glutamato é consumido uma molécula de 2-OG, os níveis de nitrogênio intracelular são inversamente proporcionais aos níveis de 2-OG, pois este serve como esqueleto carbônico da assimilação de nitrogênio. Assim sendo, ambos os metabólitos glutamina e 2-OG são indicadores de nitrogênio intracelular (van Heeswijk, Westerhoff & Boogerd, 2013; Forchhammer, 2007; Schumacher *et al.*, 2013; Huergo & Dixon, 2015)

A molécula de 2-oxoglutarato (2-OG), também conhecida como α -cetoglutarato, 2-cetoglutarato e ácido glutárico, é um metabólito intermediário do ciclo de Krebs e suas concentrações flutuam conforme a disponibilidade de nitrogênio na célula (Senior, 1975; Schumacher *et al.*, 2013), por servir de esqueleto carbônico para a assimilação de amônia na via GS/GOGAT e na via GDH. Na via GDH a enzima glutamato desidrogenase (GDH) produz uma molécula de glutamato pela

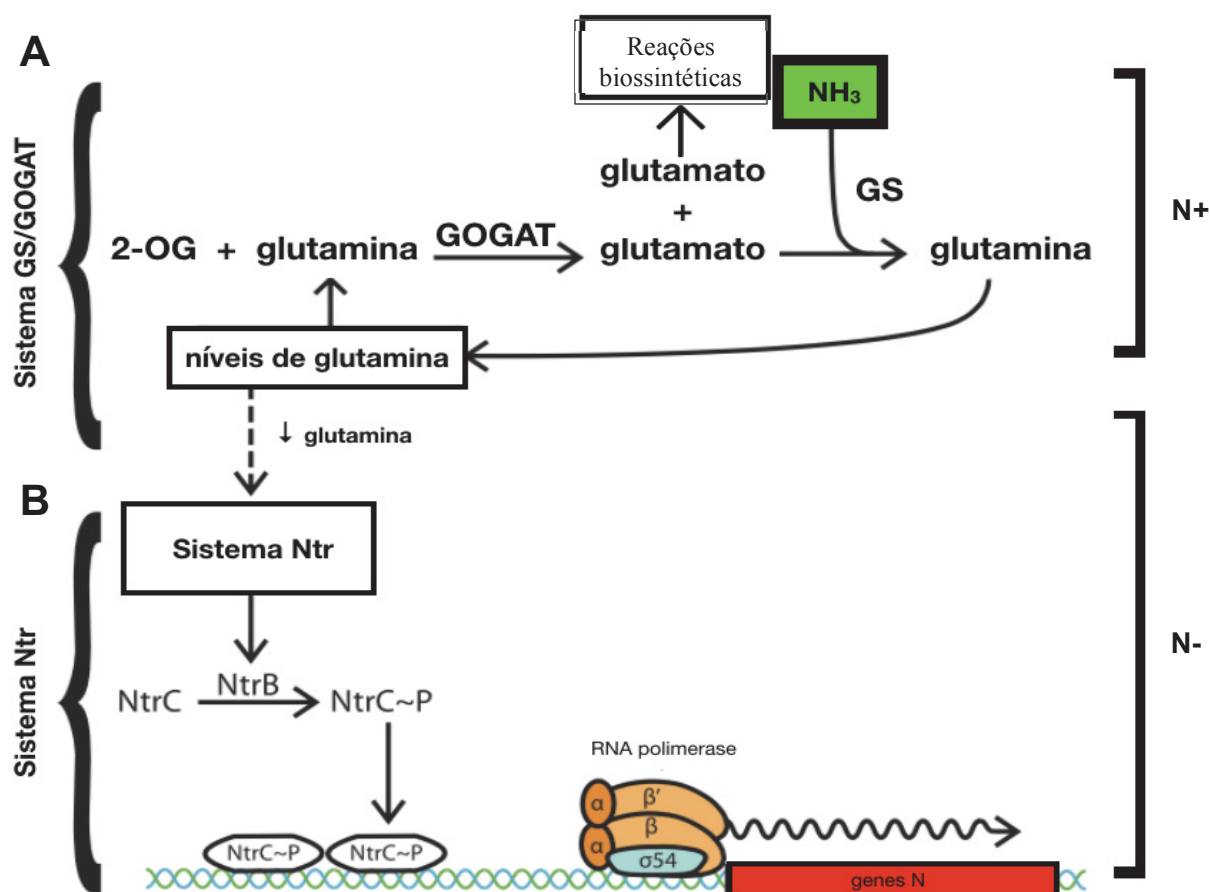


FIGURA 1 – Sistema GS/GOGAT (A) e sistema Ntr (B) em *E. coli*. Sob disponibilidade de nitrogênio (N+), a enzima GS condensa NH_3 com uma molécula de glutamato formando glutamina. O glutamato é fornecido pela atividade da enzima GOGAT, que utiliza 2-OG e glutamina para gerar duas moléculas de glutamato, das quais um é utilizado pela GS e outro para reações biossintéticas. Por sua vez, sob condições limitantes de nitrogênio (N-) os níveis de glutamina abaixam e isso sinaliza para ativação do sistema Ntr, em que NtrB fosforila NtrC, tornando NtrC ativa para promover a transcrição de genes do metabolismo alternativo de nitrogênio. FONTE: Adaptado de Bender, 2010.

condensação de uma molécula de amônia a uma molécula de 2-OG, no entanto, essa via ocorre somente sob condições abundantes de nitrogênio, uma vez que, GDH possui afinidade 10x menor à amônia ($K_m \sim 1\text{mM}$) (Sharkey & Engel, 2008; Veronese *et al.*, 1975; Sacamoto *et al.*, 1975) do que a GS ($K_m \sim 0.1\text{mM}$) (Alibhai & Villafranca, 1993; Colanduoni *et al.*, 1987; Meek & Villafranca, 1980). A determinação da concentração intracelular de metabólitos é uma tarefa bastante desafiadora, principalmente para concentrações mais baixas. Contudo, em *E. coli*, as concentrações de 2-OG encontradas na célula são relativamente variáveis, flutuando bastante conforme mudanças na disponibilidade de fonte de nitrogênio e de fonte de carbono (Zhang & Ye, 2014; Reyes-Ramirez *et al.* 2001; Radchenko *et al.*, 2010, Yuan *et al.*, 2009, Yan *et al.*, 2011). A concentração de 2-OG foi relatada a 0,05 e 1,6 mM (Reyes-Ramirez *et al.* 2001) em condições suficientes (N+) e em privação (N-) de nitrogênio, respectivamente.

Além da flutuação de acordo com os níveis de amônio, o 2-OG tem sua concentração celular afetada também em resposta à fonte de carbono. Quando cultivo de *E. coli* é submetido a crescimento com glicerol como única fonte de carbono seguido de lavagem dessas células com meio ausente de fonte de carbono, a concentração de 2-OG rapidamente diminui (Yan *et al.*, 2011). Por outro lado, quando células *E. coli* são cultivadas sob condições de privação de carbono e é adicionado glucose (choque de carbono), se observa rápido aumento dos níveis de 2-OG (Zhang *et al.*, 2013). A concentração celular de 2-OG relatada variando-se disponibilidade de carbono é de 0,35 mM em N⁺ e em carbono limitante para 2,6 mM em N⁺ e choque de carbono (Zhang & Ye, 2014). Por isso, pode-se considerar que 2-OG, além de ser indicador dos níveis de nitrogênio celular, é também indicador da disponibilidade de carbono e, possivelmente, desempenha papel integrador do metabolismo de carbono e nitrogênio. Os níveis de glutamina e 2-OG sob condições limitantes de nitrogênio levam à ativação do sistema Ntr, o sistema regulatório de nitrogênio que controla a expressão de genes necessários para o metabolismo de nitrogênio (Figura 1B).

A sinalização do status de nitrogênio dada pelos níveis de 2-OG e glutamina determina o estado conformacional de uma proteína da família PII, chamada GlnB, esta proteína atua na regulação do sistema Ntr (Figura 1B e 2). Quando sob condições suficientes de amônio, GlnB interage com NtrB e ativa sua atividade fosfatase, assim, NtrB desfosforila NtrC, resultando em repressão de genes dependentes de σ^N e de NtrC fosforilada. Quando sob condições limitantes de amônio, os níveis de glutamina intracelular diminuem e os de 2-OG aumentam, acarretando em uridililação de GlnB pela atividade de uma enzima chamada GlnD, gerando GlnB ligada covalentemente ao grupo uridilil (UMP₃). GlnB-UMP₃, assim, não mais inibe NtrB, o que resulta na auto-fosforilação de NtrB que, então, fosforila NtrC. Deste modo, NtrC fosforilada torna-se capaz de se ligar em determinados sítios de ligação no DNA, favorecendo a atividade da RNA polimerase para expressar genes do metabolismo de nitrogênio, dependentes do fator σ^N , como os genes dos operons *glnKamtB*, *glnHPQ* (expressa genes atuantes no transporte de glutamina) e do próprio *glnALG*. A interação entre GlnB e NtrB, além de ser negativamente regulada pela uridililação de GlnB, é gradualmente desfavorecida conforme ocorre aumento dos níveis de 2-oxoglutarato, que é um regulador alostérico de proteínas da família PII (van Heeswijk, Westerhoff & Boogerd, 2013; Huergo, Chandra & Merrick, 2012; Jiang, Ventura & Ninfa, 2012).

A expressão do operon *glnALG* (codificante de GS, NtrB e NtrC, respectivamente) é controlada por outro fator de transcrição, além da própria proteína NtrC, o CRP-cAMP, logo, é também dependente de fator σ^{70} , além de σ^N . Assim, NtrC e CRP competem pelo mesmo sítio de ligação a montante de *glnALG*, possibilitando uma resposta transcricional integrada com alterações do metabolismo de C e N (van Heeswijk, Westerhoff & Boogerd, 2013). Outro ponto de integração entre os metabolismos de C e N se faz pela ação da proteína CRP, diretamente atuante no controle

negativo da transcrição dos genes do operon *gltBDF*, codificantes de subunidades da enzima GOGAT (Paul *et al.*, 2007), assim, controlando também o sistema GS/GOGAT.

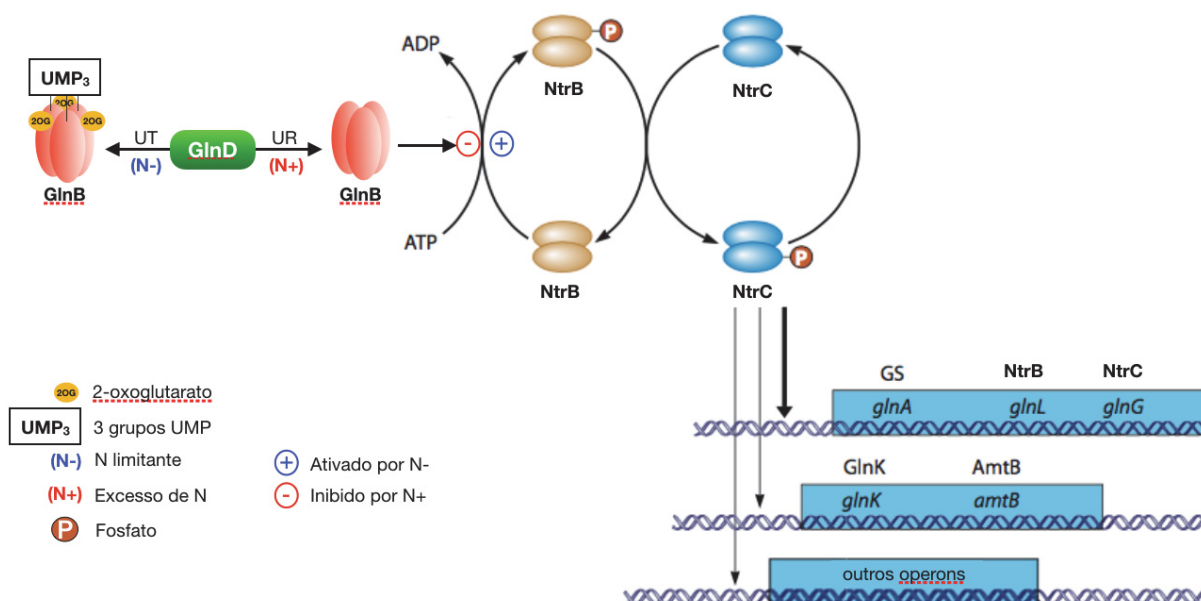


FIGURA 2 – **Controle do sistema Ntr pela GlnB.** Sob condições limitantes de nitrogênio, a enzima GlnD uridiliza as proteínas PII, que não podem interagir com NtrB, que fica livre para fosforilar NtrC. O aumento dos níveis de 2-OG também contribui para o desfavorecimento da interação GlnB-NtrB. Então NtrC-P liga-se ao DNA ativando a transcrição de diversos genes associados ao metabolismo de nitrogênio. Por outro lado, sob condições de excesso de nitrogênio, as proteínas GlnB são desuridilizadas e interagem com NtrB, inibindo a fosforilação de NtrC e, assim, sua função de ativadora da transcrição. FONTE: Adaptado de van Heeswijk, Westerhoff e Boogerd, 2013.

2.2 PROTEÍNAS DA FAMÍLIA PII

2.2.1 Características das proteínas PII

As proteínas da família PII constituem umas das famílias de proteínas transdutoras de sinais mais amplamente distribuídas na natureza, pois são encontradas em Bacteria, em archaeas fixadoras de nitrogênio e em cloroplastos de eucariotos fototróficos (algas vermelhas e plantas). Essas proteínas são amplamente descritas como sendo reguladoras do metabolismo de nitrogênio, no entanto, há outros indícios de atuação como integradora dos metabolismos de nitrogênio, carbono e energia celular (Huergo, Chandra, & Merrick, 2012; Forchhammer, 2008).

As proteínas PII são codificadas pelos genes *glnK*, *glnB* e *nifI*. Acredita-se que a origem das diferentes proteínas tipo PII ocorreu decorrente de evento de duplicação gênica e em alguns casos o parálogo de *glnB*, *glnK*, é denominado *glnZ* ou *glnJ*, como em *Azospirillum brasilense* e em *Rhodospirillum rubrum* (proteobactérias fixadoras de nitrogênio), respectivamente (Huergo, Chandra

& Merrick, 2012). Em *Escherichia coli* e na maioria das proteobactérias são encontrados os genes parálogos *glnK* e *glnB*. Os genes *nifI*, por sua vez, são encontrados como *nifI1* e *nifI2* em Archaea, Proteobacteria, Chlorobi, Chloroflexi e Firmicute (Dodsworth, Cady & Leigh, 2005; Sant' Anna *et al.*, 2009; Portugal *et al.*, 2011). Esses genes estão localizados entre os genes *nifH* e *nifD*, com os quais NifI possui uma ligação funcional direta. Os genes *nifH*, *nifK* e *nifD* codificam as proteínas NifH (dinitrogenase redutase) e NifDK (dinitrogenase), constituintes mais comuns da enzima nitrogenase, a qual realiza a fixação biológica do nitrogênio atmosférico e são reguladas negativamente pelas proteínas NifI em resposta aos níveis de 2-oxoglutarato (2-OG) (Kessler & Leigh, 1999; Sant' Anna *et al.*, 2009; Leigh & Dodsworth, 2007). A partir de agora, o termo PII refere-se à família de proteínas PII em geral. Para as proteínas PII de um determinado organismo será citado, como por exemplo, “as proteínas PII de *E. coli*”, entendendo-se GlnB e GlnK de *E. coli*.

O gene *glnK* é na maioria das vezes localizado em um operon juntamente com o gene *amtB*. Em *E. coli*, o gene *glnK* está localizado a montante do gene *amtB* no operon *glnKamtB* e esses genes não são essenciais para o crescimento da célula (Thomas, Coutts & Merrick, 2000). A transcrição do operon *glnKamtB* é regulada de acordo com a disponibilidade de nitrogênio. Sob condições limitantes de nitrogênio a expressão de *glnKamtB* é estimulada e sob condições de alta disponibilidade de nitrogênio sua expressão é reprimida. Esse operon é controlado por promotor dependente de σ^{54} (ou σ^N), através do sistema Ntr, o qual tem função de ativar a expressão global de genes para assimilação alternativa de nitrogênio em proteobactérias. Assim, para transcrição de *glnKamtB* é requerida condição limitante de nitrogênio e ativação do sistema Ntr (Leigh & Dodsworth, 2007; Arcondéguy *et al.*, 2001; van Heeswijk, Westerhoff & Boogerd, 2013; Tremblay & Hallenback, 2009).

O gene *glnB* de *E. coli*, que codifica a outra proteína da família PII, a proteína GlnB, não está em um operon e possui expressão constitutiva a partir de quatro promotores não-dependentes de σ^N . Um operon relacionado ao gene *glnB*, a montante, é codificante para duas proteínas de funções desconhecidas, dentre as quais, uma possui alto grau de homologia com NtrC (Arcondéguy, Jack & Merrick, 2001; van Heeswijk, Westerhoff & Boogerd, 2013; Huergo, Chandra & Merrick, 2012).

2.2.2 Estrutura das proteínas PII e sua regulação alostérica

As proteínas PII são proteínas transdutoras de sinais devido sua capacidade de sinalizar o estado metabólico celular por meio do sensoriamento dos níveis de nitrogênio, carbono e energia. Os níveis de 2-OG são indicadores dos níveis de carbono e/ou nitrogênio na célula (Reyes-Ramirez *et al.*, 2001; Schumacher *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013). Os níveis de glutamina sinalizam os níveis de nitrogênio e os de ATP e ADP indicam o estado energético. A transdução dos sinais de nitrogênio, carbono e energia é resultante da capacidade que PII possui de ligação direta aos

metabólitos 2-OG e ATP/ADP, de forma alostérica, e ao grupo uridilil (UMP), de forma covalente em resposta aos níveis de glutamina (Xu *et al.*, 1998; Truan *et al.*, 2010; Rajandran *et al.*, 2011; Jiang & Ninfa, 1998; Jiang & Ninfa, 2007; Fokina *et al.*, 2010; Engleman & Francis, 1978; Palanca *et al.*, 2017). Além disso, em todo o domínio Plantae, exceto *Brassicaceae*, as proteínas PII parecem ligar-se diretamente à glutamina (Chellamuthu *et al.*, 2014).

As proteínas PII de *E. coli*, GlnB e GlnK, apresentam 67% de identidade (Figura 3B) e são proteínas homotriméricas com características estruturais bastante favoráveis para interação proteína-proteína, como a presença de 3 flexíveis e protuberantes *loops* por monômero que adotam diferentes conformações. As diferentes conformações que adotam os *loops* de PII ocorrem pela ligação dos efetores alostéricos MgATP, ADP e 2-OG e também pela ligação covalente e reversível de grupo UMP a um dos *loops*, chamado de *loop-T*, de acordo com os níveis de glutamina intracelular (Xu *et al.*, 1998; Truan *et al.*, 2010; Rajandran *et al.*, 2011; Jiang & Ninfa, 1998; Jiang & Ninfa, 2007; Fokina *et al.*, 2010; Engleman & Francis, 1978; Palanca *et al.*, 2017). A capacidade de sofrer modificação estrutural de acordo com a concentração intracelular de diversos metabólitos provê uma ampla capacidade às proteínas PII de serem reguladoras da atividade de diversos alvos-chave no metabolismo, controlando a ação de proteínas como proteínas de membrana, enzimas e fatores de transcrição (Huergo, Chandra & Merrick, 2012)

Cada monômero das proteínas PII de *E. coli*, GlnK e GlnB, apresenta 112 resíduos de aminoácidos, os quais arranjam-se em um homotrímero que possui estrutura em forma de barril (Figura 3A), formado por 2 cadeias α -hélices e seis cadeias- β . Essa estrutura está arranjada de tal forma que 2 α -hélices e 4 cadeias- β formam um duplo motivo $\beta\alpha\beta$ conectados por um longo *loop*, chamado de *loop-T*, constituído por 19 resíduos de aminoácidos (resíduos 38-56). O *loop-T* está localizado entre a cadeia- β 2 e a cadeia- β 3. O segundo *loop* chamado de *loop-B*, menor que o *loop-T*, é formado pelos resíduos 82-88 e ocorre entre a α -hélice 2 e a cadeia- β 4 na porção C-terminal da proteína. Há ainda um terceiro *loop*, o *loop-C*, formado pelos resíduos 102-106, localizado depois da cadeia- β 4, já na porção final C-terminal (Cheah *et al.*, 1994). Esses *loops* são bastante conservados dentro da família PII. Na interface de interação entre os monômeros do trímero de PII, os *loops* B, C e T constituem a fenda de ligação (Figura 4A), onde ocorrem os sítios de ligação para os efetores ATP, ADP e 2-OG (Huergo, Chandra & Merrick, 2012).

A estrutura das proteínas PII pode apresentar semelhança com estrutura de proteínas com funções regulatórias (Forchhammer, 2008). A estrutura trimérica e pequena com *loops* flexíveis, muito semelhantes a estrutura de PII, é vista em muitas proteínas regulatórias em bactérias, archaeas, cianobactérias, plantas e mamíferos (Forchhammer e Luddecke, 2016), dentre as quais algumas apresentam funções parecidas. Como por exemplo a proteína DarA de *Bacillus subtilis* que mesmo possuindo apenas 16% de identidade de sequência com PII, apresenta 88% de similaridade estrutural.

Essa proteína é capaz de ligar AMP cíclico nas fendas entre suas subunidades constituintes alterando a conformação de seus *loops*, assim como a ligação entre os nucleotídeos ATP/ADP em PII (Gundlach *et al.*, 2015).

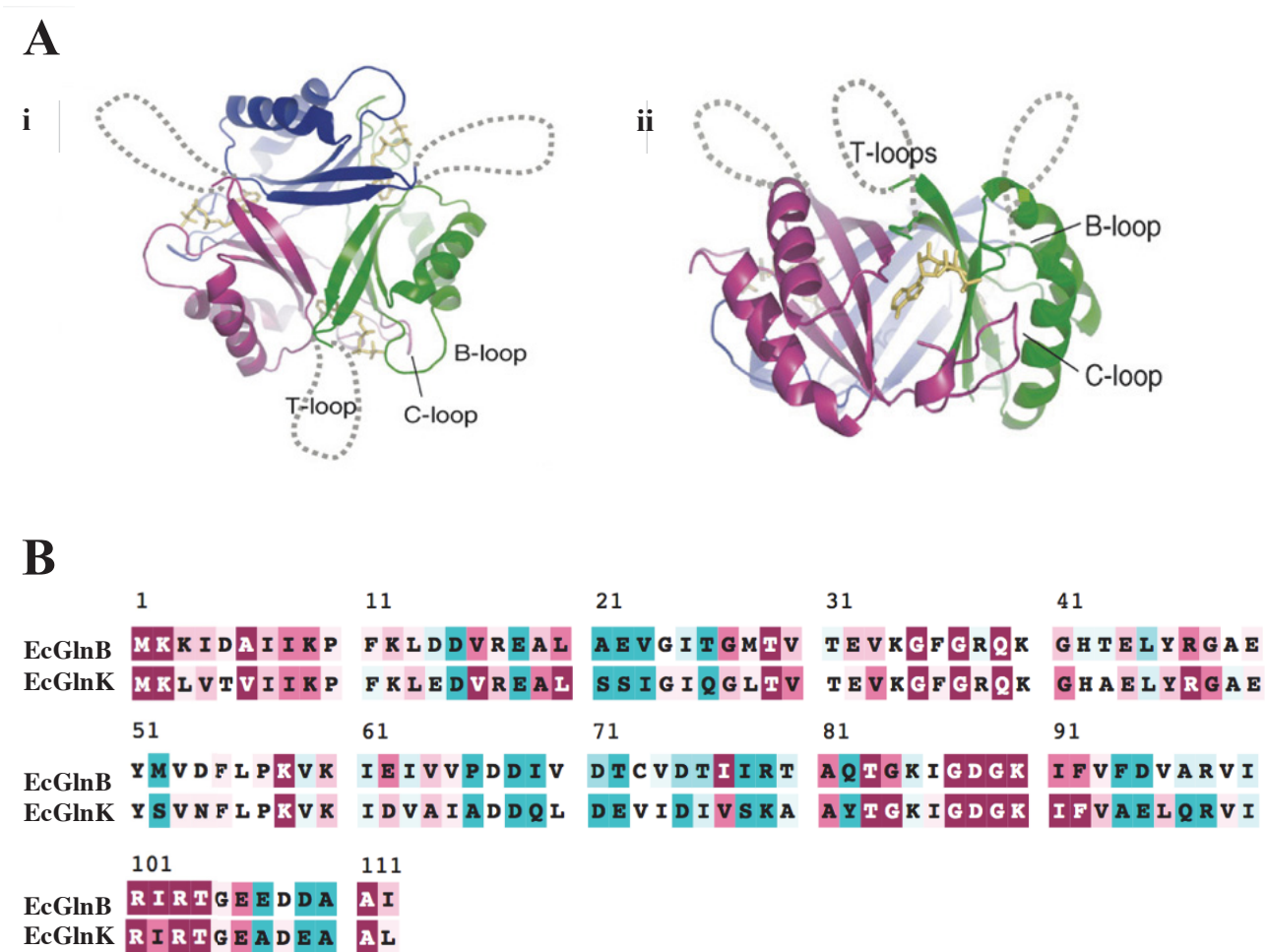


Figura 3 – **Estrutura geral das proteínas PII.** (A) Cada subunidade do trímero de PII está representada em diferentes cores (não relacionadas com B). Os maiores *loops* estão representados em linhas pontilhadas, os *loops*-T, representando seu caráter de alta flexibilidade. **i:** visão superficial de PII; **ii:** Visão lateral de PII. Bastões em amarelo correspondem ao ADP no sítio de ligação. FONTE: Forchhammer, 2008. **Análise de sequencia de aminoácidos das proteínas PII.** (B) Nível de conservação de aminoácidos determinado por alinhamento múltiplo de sequencia (MAFFT) com proteínas homólogas (HEMMR) por algoritmo ConSurf. Escala crescente de conservação de aminoácidos: 1 2 3 4 5 6 7 8 9.

Nas proteínas PII, o *loop*-T parece ser a estrutura mais determinante nas interações PII com proteínas alvo (Forchhammer, 2008), sendo a porção mais afetada pela ligação dos efetores na fenda de ligação (Xu *et al.*, 1998; Conroy *et al.*, 2007; Truan *et al.*, 2010). Foi demonstrado que a interação de GlnB de *E. coli* com alguns de seus alvos, tais como ATase, AmtB e a proteína NtrB, são altamente dependentes do *loop*-T (Jaggi *et al*, 1996; Jiang *et al*, 1997a; Jiang *et al*, 1997b) e a conformação do

loop-T é dependente do efector ligado na fenda de ligação na base do *loop-T* entre as subunidades (Huergo, Chandra & Merrick, 2012).

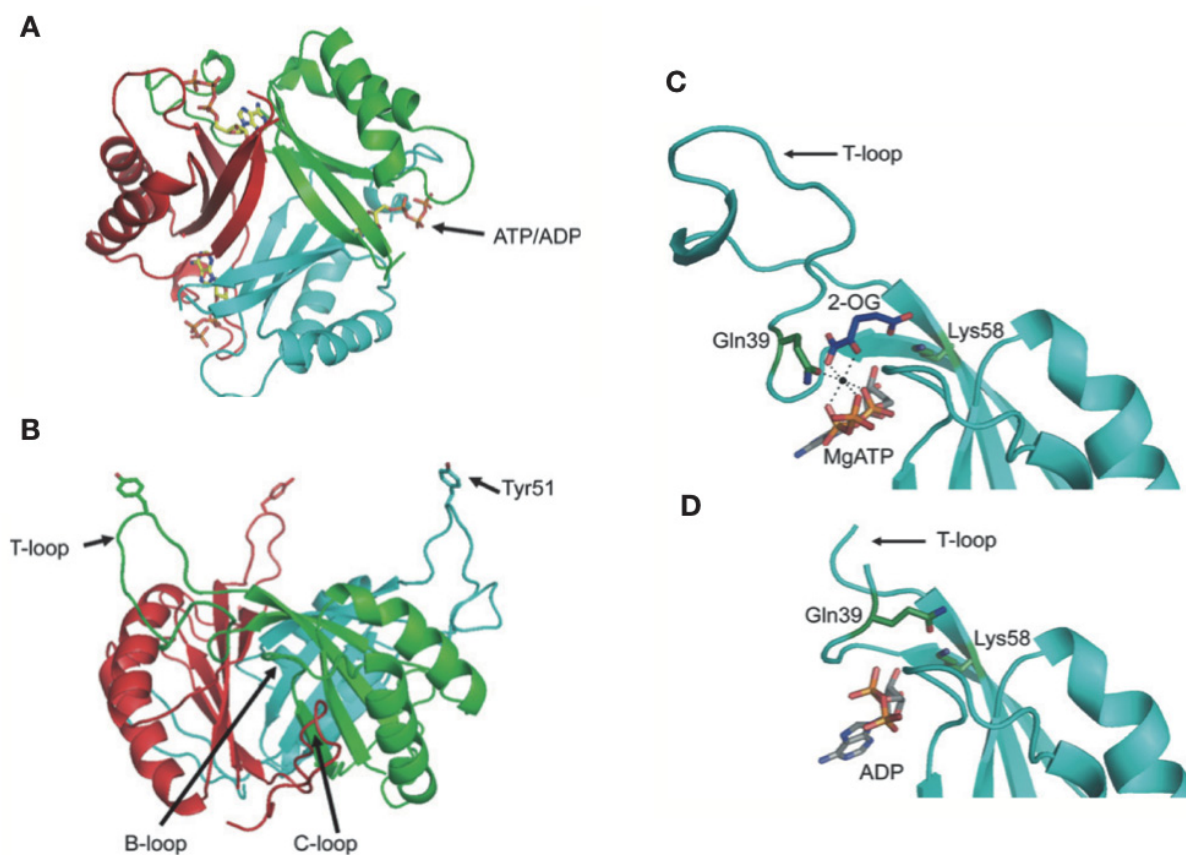


FIGURA 4 – **Modificações na estrutura das proteínas PII.** **A:** Indicação da fenda lateral, vista superficial; **B:** Indicação do resíduo de tirosina 51 do *loop-T*, passível de uridililação; **C:** Ligação de MgATP-2-OG; **D:** Ligação do ADP. FONTE: Huergo, Chandra & Merrick, 2012.

Em *Synechococcus elongatus* foram verificadas até 3 moléculas de ATP, 2-OG e Mg^{2+} ligadas simultaneamente em cada trímero na estrutura de cristal de PII (Figura 4C). Em *S. elongatus* e *E. coli*, ATP e 2-OG apresentam cooperatividade negativa de ligação à PII, de tal modo que o K_d da segunda e terceira molécula aumenta consideravelmente em relação ao K_d da primeira molécula (Fokina *et al*, 2010b; Kamberov *et al*, 1995; Jiang, Peliska & Ninfa, 1998). Os resíduos que estabilizam a ligação das moléculas de MgATP + 2OG concomitantemente são os resíduos altamente conservados de Lys58 e Gln39. A Lys58 realiza ponte salina com grupo 5-carboxil do 2-OG, por sua vez, a Gln39 realiza 3 pontes de hidrogênio com oxigênios dos fosfatos α , β e γ da molécula de ATP e duas pontes de hidrogênio com dois oxigênios da porção ácido 2-oxo de 2-OG (Truan, 2010). Em *A. thaliana*, na ausência de 2-OG, o resíduo de Glu55 (análogo de Glu44 bacteriana) parece tomar o lugar desse metabólito em estrutura de PII ligada com MgATP, sem 2-OG (PDB ID 2RD5).

É notável a ampla gama de possibilidades conformacionais no *loop-T* e fenda de ligação que as proteínas PII podem adotar. Cada monômero pode adotar uma determinada conformação em consequência de ligação de ADP, MgATP ou MgATP-2-OG nas proteínas PII (Figura 4), os quais

são estabilizados pela interação dos resíduos Lys58 com Gln39, com Gln44 ou com grupo 5-carboxil de 2-OG, respectivamente (Truan *et al.*, 2010). A ligação do ATP e ADP ocorre de forma competitiva em PII de *E. coli*, sendo a ligação do ATP no sítio de ligação co-operativa com 2-OG e a ligação do ADP antagônica a 2-OG (Jiang *et al.*, 2007) assim como em outros organismos (Smith *et al.*, 2003; Fokina *et al.*, 2010b; Gerhardt *et al.*, 2012)

O 2-OG é uma molécula intermediária do ciclo do ácido cítrico que tem sido descrita como sendo sinalizadora intracelular dos níveis de carbono. O nível de 2-OG é significativamente reduzido quando *E. coli* é submetida à privação de carbono (Yan., 2011; Zhang *et al.*, 2013). Além disso, 2-OG causa diminuição da produção de cAMP, o indutor primário da expressão de genes de proteínas catabólicas de carbono (You *et al.*, 2013). A determinação da concentração fisiológica de ATP e de ADP é bastante variável, no entanto, o que parece ser determinante para as funções celulares é a razão ADP/ATP, que sob condições de suficiência de fonte de carbono é relatada como sendo 0,8-0,95, podendo atingir valores menores sob privação de carbono, relatados de 0,1 a 0,5 (Chapman *et al.*, 1971; Bennett *et al.*, 2009; Jiang & Ninfa, 2007; Petersen & Moller, 2000). Contudo a determinação de correta concentração fisiológica de metabólitos é bastante difícil devido a capacidade rápida de mudança das concentrações, influenciadas durante os processos de extração (Huergo & Dixon, 2015).

2.2.3 Enzima GlnD bifuncional – Uridililação/desuridililação das proteínas PII

Em proteobactérias, as proteínas PII podem ser modificadas por ligação covalente de um grupo uridilil (UMP) no resíduo Tyr51 do *loop*-T de cada monômero (Figura 4B), sendo possível encontrar as espécies de PII parcialmente uridililadas (PII-UMP₁ e PII-UMP₂) e totalmente uridililada (PII-UMP₃), ou seja, com 1, 2 ou 3 grupos UMP ligados, respectivamente (Bonatto *et al.*, 2007; Araújo *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2011; Engleman & Francis, 1978). A estrutura cristalográfica de GlnB-UMP₃ de *E. coli* sugere que a adição de UMP não estabiliza o *loop*-T (Palanca *et al.*, 2017), uma vez que não foi possível se obter a estrutura do *loop* devido seu caráter de flexibilidade, o que não favorece determinação de estrutura. Já foi possível observar o *loop*-T em estruturas cristalográficas de PII não uridililadas, porém, sob diferentes conformações por Cheah *et al.*, (1994) e Carr *et al.*, (1996).

A uridililação e desuridililação das proteínas PII é catalisada pela atividade uridililtransferase (UTase) e atividade removedora de uridilil (UR) da enzima bifuncional GlnD (Figura 2). A enzima GlnD é codificada pelo gene *glnD*, regulado por fator σ^{70} e, possivelmente, pelo fator σ^{54} de forma parcial, logo, o transcrito de *glnD* seria parcialmente controlado pelo metabolismo de nitrogênio, no entanto, essa regulação por nitrogênio não está bem estabelecida e mais estudos são necessários (van Heeswijk, Westerhoff & Boogerd, 2013). Interessantemente, o gene *glnD* é transcrito a partir de um

cluster *glnKamtBglnD* em Actinobacteria, diferentemente de proteobactéria, em que *glnD* está localizado sozinho no genoma (Arcondéguy & Merrick, 2001).

A enzima GlnD possui 890 resíduos de aminoácidos, cuja massa teórica seria de ~102kDa, porém, essa proteína migra com peso molecular de cerca de 89-kDa em SDS-PAGE (van Heeswijk *et al.*, 1993) e se relata comportamento em gel filtração de uma proteína de aproximadamente 100 kDa (Kamberov *et al.*, 1994), o que indicaria estado de oligomerização monomérico de GlnD. Não há nenhuma proteína homóloga à GlnD com alto grau de identidade, no entanto, estudo de mutagênese sítio dirigida (Zhang *et al.*, 2010) e análise de sequências permitiram conhecer melhor alguns aspectos de GlnD. GlnD é constituída por 4 domínios (pfam), o domínio nucleotidiltransferase (NT), (localizado na porção N-terminal da proteína) que possui função de adicionar o grupo uridilil em PII, o domínio HD (região central da proteína) que possui função de remover o grupo uridilil e 2 (dois) domínios ACT C-terminais, encontrado em proteínas capazes de se ligar à aminoácidos, no caso da GlnD, o aminoácido ligante é a glutamina (Engleman & Francis, 1978; Jiang, Peliska & Ninfa, 1998) (Fig. 5).

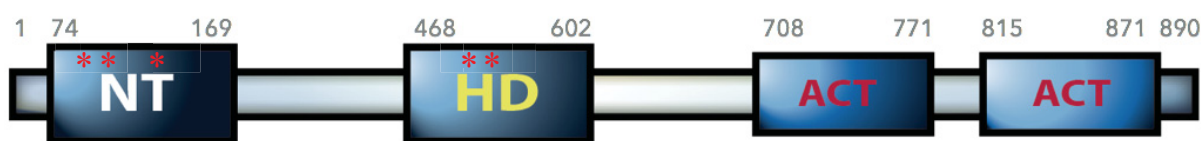


FIGURA 5 – Esquema representativo da organização dos domínios da enzima GlnD de *E. coli*. O domínio NT abrange os resíduos 74-169 na porção N-terminal da enzima. O Domínio HD centralizado é constituído pelos aminoácidos 468-602. O domínio ACT ocorre em duplicidade, formado pelos resíduos 708-771 (ACT1) e 815-871 (ACT2). Asteriscos vermelhos representam as mutações pontuais abordadas no texto. No domínio NT os asteriscos correspondem aos resíduos 93, 94 e 107 e no domínio HD aos 514 e 515. FONTE: O autor, baseado no pfam.

O domínio nucleotidiltransferase (NT) é um domínio conservado encontrado em proteínas que constituem uma ampla superfamília de proteínas bastante diversificadas, que catalisam a transferência de um nucleotídeomonofosfato (NMP) a partir de um nucleotídeo trifosfato (NTP) para um grupo hidroxila aceptor que pode ser uma proteína, um ácido nucleico ou ainda uma pequena molécula carbônica. As enzimas membro dessa superfamília realizam importantes funções biológicas, como a poliadenilação de RNA (como a poliA polimerase), reparo de DNA (como as DNA-polimerases β , λ e μ), regulação da atividade de enzimas-chave (como a ATase), transdução de sinais intracelulares (como a GlnD), entre outras (Kuchta *et al.*, 2009).

A ATase, codificada pelo gene *glnE*, é uma proteína que possui função proximamente relacionada à GlnD no sistema de assimilação de nitrogênio bacteriano, que também possui o domínio

NT, no entanto, ATase possui dois domínios NT homólogos, com cerca de 25% de identidade entre si quando as porções C e N-terminal são alinhadas (Jaggi *et al.*, 1997). GlnD e ATase possuem 27% de identidade em seu comprimento total, já os seguimentos de sequência de aminoácidos dos domínios NT de GlnD (resíduos 74-169) e da ATase possuem 24% de identidade com NT C-terminal da ATase (593-813) e 24% com NT N-terminal da ATase (1-440, alinhando entre os resíduos 121-300) (Clustal Omega). Os domínios NTs são em geral similares, mas não possuem idênticas topologias (Figura 6). O motivo estrutural de NT que caracteriza o sítio de ligação a metal na ATase consiste em 3 cadeias β adjacentes, das quais a primeira ($\beta 1$) é anti-paralela as demais ($\beta 1$ e $\beta 2$). No fim da $\beta 1$ há uma glicina conservada em todas as estruturas conhecidas que inicia um pequeno *loop* que conecta uma hélice à $\beta 2$. No início da $\beta 2$ há dois resíduos de aspartato (701 e 703) que são resíduos de ligação à metal. Outro resíduo de ligação à metal é o Asp752 na terceira cadeia- β ($\beta 3$), esta é conectada à $\beta 2$ por uma hélice ($\alpha 14$). Esta conexão $\beta 3$ - $\beta 2$ pode variar em outras proteínas (Figura 6) (Xu *et al.*, 2010). Alinhamento entre os domínios NT da GlnD de *E. coli* com domínios NT de outras proteínas revelam alguns aminoácidos conservados, como a glicina 93, glicina 94 (serina ou lisina em alguns membros), aspartato 105 e aspartato 107. A deleção do domínio NT de GlnD de *E. coli* anula sua atividade nucleotidiltransferase (UTase) e mutação nos resíduos G93L/V, G94V e D107A/V/Y causaram perda funcional quase completa deste domínio (Zhang *et al.*, 2010).

Outro domínio conservado encontrado na enzima GlnD é o domínio central chamado domínio HD. Esse domínio, que abrange os resíduos de aminoácidos 468-602 de GlnD, é o menos conhecido domínio desta enzima (pfam). Entre os resíduos mais conservados no domínio HD estão os de histidina (H) e aspartato (D), característica que dá nome ao domínio e que indica que a coordenação com cátions divalentes são essenciais para a atividade dessas proteínas (Aravind & Koonin, 1998). Domínios HD são encontrados em enzimas de Bacteria, Archaea e Eukariota, que possuem atividade fosfohidrolase e estão relacionadas a proteínas com funções no metabolismo de ácidos nucleicos, transdução de sinais, entre outras. A estrutura cristalográfica de uma proteína hipotética de *Aquifex aeolicus* depositada no PDB (O67745) descrita como proteína constituída de domínio HD, pertencente a superfamília das fosfohidrolases metal-dependentes, é formada por 371 resíduos de aminoácidos (44kDa) (Oganesyan *et al.*, 2007), no entanto, essa proteína possui apenas alguns poucos resíduos que alinham com a sequência de aminoácidos do domínio HD (468-602) da GlnD de *E. coli*, totalizando apenas 23% de cobertura (análise no BLASTp).

A ausência do domínio NT e mutantes G93L/V mostraram uma pequena perda de atividade removedora de uridililil (UR) na presença de Mg^{2+} , mas não na presença de Mn^{2+} , indicando relação entre os domínios NT e HD de alguma forma. Por sua vez, deleção do domínio HD e as duplas substituições nos resíduos H514A + D515A e H514Q + D515N causaram efeito deletério à atividade UR de GlnD, mas não afetaram a atividade UTase (Zhang *et al.*, 2010).

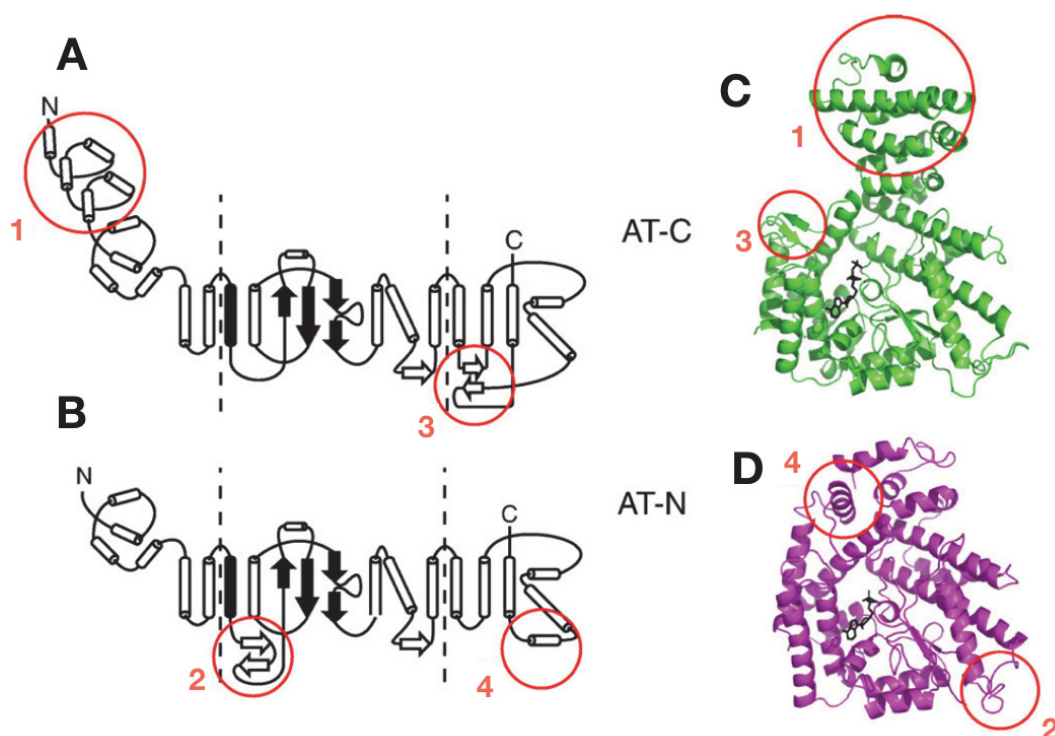


FIGURA 6 – Estrutura geral dos domínios NT da ATase de *E. coli*. A: Esquema do arranjo estrutural do domínio NT C-terminal (AT-C); B: Esquema do arranjo estrutural do domínio NT N-terminal (AT-N); C: Representação Ribbon de AT-C; D: Representação Ribbon de AT-N; Círculos vermelhos indicam as diferenças estruturais indicadas entre os domínios FONTE: Adaptado de Xu *et al.*, 2010.

A enzima GlnD de *E. coli* possui dois domínios ACT, presentes na porção C-terminal da enzima. ACT é um domínio estrutural encontrado em uma ampla gama de proteínas com estruturas bastante variadas e que em geral possuem capacidade de ligação a aminoácidos. Proteínas com esse domínio são encontradas em Bactéria, Archaea e eucariotos, inclusive plantas, fungos e até mamíferos. ACT é um motivo estrutural formado por 70-80 aminoácidos (Grant, 2006). Na GlnD de *E. coli* os domínios ACT compreendem aos resíduos 708-771 (ACT1) e 815-871 (ACT2). Os dois domínios ACT não são idênticos e apresentam apenas 30% de identidade de sequência de aminoácidos (BLASTp). A primeira estrutura de uma proteína contendo um domínio ACT a ser resolvida foi da enzima 3-fosfoglicerato deshidrogenase, ligante de serina, de *E. coli* (Schuller *et al.*, 1995), que possui estrutura tetramérica com um domínio ACT por subunidade. Esta proteína é estruturalmente representativa entre domínios ACT (Figura 7) e é composta por 4 cadeias β e duas α -hélices que formam um arranjo $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$, em que a cadeia β 1 conecta-se a α 1, esta conecta-se a β 2 por um longo *loop*. β 2 é uma cadeia β bastante curta que por um breve *loop* está conectada à β 3, de onde segue outro *loop* mais longo até a hélice α 2, que por fim, é conectada à cadeia β 4. Essa estrutura,

no entanto, somente foi reconhecida como um motivo recorrente anos depois, após a resolução das estruturas de 3 proteínas que apresentam esse motivo, cujas letras iniciais que as nomeiam dão nome ao domínio, são elas a aspartato quinase, a clorismato mutase e a TyrA (Grant, 2006).

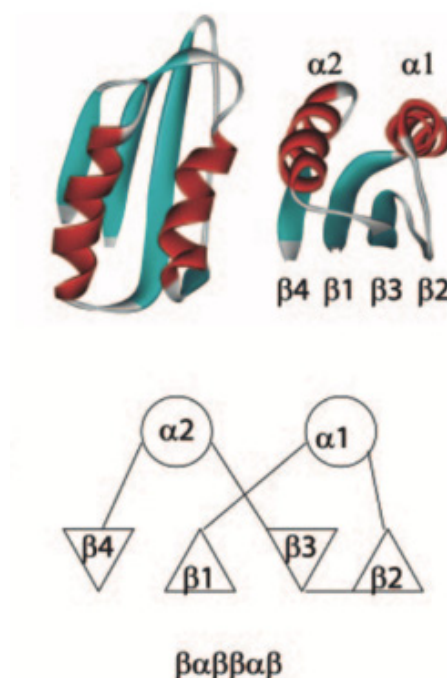


FIGURA 7 – **Arranjo estrutural conservado do domínio ACT.** Domínio ACT da 3-fosfoglicerato desidrogenase (ligante de serina) de *E. coli* mostrando o arranjo $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ do motivo. O diagrama de traços círculos e triângulos representam *loops*, α -hélices e cadeias- β , respectivamente. FONTE: Grant, 2006.

A maioria das proteínas que apresentam o domínio ACT possuem capacidade de interação com aminoácidos, regulando transcricionalmente genes relacionados ao metabolismo desses aminoácidos. No entanto, algumas proteínas evoluíram para interagir com outros ligantes (Grant, 2006). No caso da enzima GlnD, provavelmente esses domínios ACT são responsáveis por prover a GlnD a capacidade de sensoriar os níveis intracelulares de glutamina, o aminoácido formado pelo sistema GS/GOGAT a partir da absorção de amônio.

Em estudo *in vitro* de caracterização da atividade da enzima GlnD usando proteínas mutantes de *E. coli* foi possível conhecer muitos aspectos desta enzima. No que diz respeito aos domínios ACT, foram utilizadas as construções GlnD Δ ACT1e2 (ausente de ambos os domínios ACT) e Δ ACT2 (ausente apenas do domínio ACT2) para mensurar a atividade UR e UTase. A atividade UTase foi drasticamente reduzida pela deleção dos dois (ACT1e2) ou de um domínio (ACT2), o que permite inferir que ACT é domínio estimulatório da atividade realizada pelo domínio NT, a atividade UTase Zhang *et al.*, 2010).

É conhecido que a atividade UR (desuridililação) ocorre de forma independente de glutamina mas é estimulada pela presença de glutamina (Engleman & Francis, 1978; Jiang, Peliska & Ninfa, 1998), tal estímulo foi confirmado medindo-se a atividade UR das construções GlnD Δ ACT1e2 e Δ ACT2 de *E. coli*, em que o mutante Δ ACT1e2 apresentou atividade UR aumentada, assim como a GlnD selvagem na presença de glutamina, no entanto, GlnD Δ ACT1e2 mostrou atividade UR aumentada na presença e na ausência de glutamina, indicando que ACT exerce um efeito inibitório sobre o domínio HD, efeito que é desfeito quando glutamina liga-se em ACT. GlnD Δ ACT2 apresentou atividade semelhante à de GlnD selvagem na ausência de glutamina, tanto na presença como na ausência desse aminoácido, o que indica que ambos os domínios ACT são necessários para o estímulo, ou não inibição, da atividade do domínio HD, a atividade UR ou desuridililação (Zhang *et al.*, 2010).

Sendo assim, em resumo, no modelo proposto de inter-relacionamento entre os domínios de GlnD por Zhang *et al.* (2010), quando sob condições limitantes de nitrogênio, glutamina está sob baixa concentração, assim, a GlnD possui sua atividade UTase/uridililação estimulada e atividade UR inibida concomitantemente pelos domínios ACT, e PII é uridililada. Por outro lado, quando sob choque de amônio, a glutamina aumenta de concentração, ligando-se nos domínios ACT, os quais, então, por estarem ligados à glutamina, adotam conformação não inibitória da atividade do domínio HD, a atividade UR/desuridililação. A inibição da atividade UTase por glutamina, por sua vez, é de complicada interpretação, uma vez que, há efeito inibitório proveniente do estímulo da atividade UR frente a presença deste aminoácido. Zhang *et al.* (2010) identificaram a ocorrência de um ciclo fútil de uridililação/desuridililação em ensaios de UTase sob condições de atividade UR (presença de glutamina). E em ensaios com GlnD mutantes ausentes de atividade UR, a atividade UTase não apresentou resultado significativamente diferente na presença ou ausência de glutamina, nem em ensaios com mutantes ACT.

O metal divalente fisiologicamente relevante para a atividade de GlnD era sugerido como sendo o Mg^{2+} (Jiang & Ninfa, 1998), no entanto, a concentração fisiológica de cada metal (Mg^{2+} e Mn^{2+}) seria de imprescindível importância para essa determinação. Além disso, parece haver dois sítios de ligação a metal na GlnD, no domínio NT e no domínio HD, ou ainda mais que dois, o que torna ainda mais difícil entender como cada metal contribui para cada mecanismo enzimático de GlnD (Zhang, *et al.*, 2010).

A enzima GlnD de *E. coli*, além de uridililar PII, pode também adicionar outros nucleotídeos a partir de CTP, GTP ou ATP, porém, GlnD usa com muito maior preferência o UTP (UTP 2200 mM/min, CTP 170 mM/min, GTP 21 mM/min e ATP 12mM/min) (Jiang & Ninfa, 1998). De qualquer forma, isso mostra que PII pode receber outros nucleotídeos e que GlnD pode adicionar outros nucleotídeos, que não somente UMP. Tanto que nas actinobactérias *Streptomyces coelicolor*

(Hesketh *et al.*, 2002) e *Corynebacterium glutamicum* GlnD adiciona AMP ao invés de UMP ao resíduo Tyr51 em condições deficientes de nitrogênio (Strosser *et al.*, 2004). Em algumas cianobactérias, as proteínas PII são modificadas por fosforilação de um resíduo de Ser49, no *loop*-T (Forchhammer e Tandeau de Marsac, 1994; Forchhammer e Tandeau de Marsac 1995; Kloft *et al.*, 2005) em resposta a condições limitantes de nitrogênio, assim como em Proteobacteria. No entanto, a proteína quinase que realiza essa modificação em PII ainda não foi identificada, conhecendo-se somente a proteína que realiza desfosforilação de PII, a proteína fosfatase PphA (Kloft *et al.*, 2005). A desfosforilação de PII é inibida na presença de 2-OG e MgATP (Irmeler e Forchhammer, 2001; Ruppert *et al.*, 2002). Além da fosforilação, em cianobactéria foi descrita também nitratação do resíduo Tyr51 (Zhang *et al.*, 2007), embora a função fisiológica desta modificação não esteja bem determinada. Apesar dos vários relatos de modificação pós-traducional enzimática nas proteínas PII, há ainda organismos cuja modificação não foi identificada ou ainda nem ocorra, como em PII de Archaea, Firmibacteria, algumas cianobactérias e plantas (Huergo, Chandra & Merrick, 2012).

A modificação pós-traducional das proteínas PII é um importante evento regulatório do metabolismo e conhecer mais aspectos sobre essa modificação é essencial para se entender o funcionamento metabólico da célula no que diz respeito aos processos de transdução de sinais que envolvem as proteínas PII e as proteínas que as modificam. Em *E. coli*, a ausência de *glnD* gera crescimento celular severamente defeituoso (Arcondéguy & Merrick, 2001). No entanto, é relatado que a deleção do gene *glnD* gera inviabilidade celular na bactéria fixadora de nitrogênio *Sinorhizobium meliloti* (Rudnick *et al.*, 2001). Porém, em mutante com porção N-terminal deletada de *glnD* resultou em bactéria capaz de fixar nitrogênio, mas com uma ineficiente simbiose com planta leguminosa (alfalfa). Neste caso, sendo somente conhecido como papel de GlnD o de uridililação e desuridililação de PII, é sugerido que GlnD possa desempenhar outro papel na célula ainda não conhecido, (Yurgel e Kahn, 2008).

Desta forma, ressalta-se aqui a grande importância que se tem de se conhecer mais sobre GlnD, uma vez que é uma proteína muito pouco estudada. Estudos estruturais de GlnD poderiam esclarecer diversos fatores até hoje incertos sobre sua regulação e sua catalise.

2.2.4 Interações PII/proteínas-alvo

A atividade regulatória realizada pelas proteínas PII se dá por meio da interação direta com outras proteínas-alvo de acordo com os sinais metabólicos exercidos pelos níveis de glutamina, 2-OG, MgATP e ADP. O número de interações proteína-proteína mediadas por PII descritas até o momento é amplo e ainda crescente. Em *E. coli*, as proteínas-alvo de PII conhecidas e bem estabelecidas como proteínas-alvo são: a proteína NtrB (interage com GlnB no sistema de regulação

da expressão de genes do metabolismo de nitrogênio), a ATase (que interage com GlnB no controle do sistema GS/GOGAT) e AmtB (que interage com GlnK no controle da absorção de amônia) (Huergo, Chandra & Merrick, 2012; van Heeswijk, Westerhoff & Boogerd, 2013).

2.2.4.1 Interação GlnK-AmtB

A mais bem caracterizada interação entre PII e uma proteína alvo é a interação GlnK-AmtB, encontrada em bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e *Archaea* (Huergo, Chandra e Merrick, 2012). A AmtB é uma proteína de membrana pertencente a família das proteínas transportadoras de amônio Amt/MEP/Rh encontrada em todos os domínios da vida. Embora não esteja bem estabelecido qual elemento é transportado por essas proteínas, se amônio ou amônia (Tremblay & Hallenbeck, 2009) parece que ambos podem ser transportados (Abdulnour-Nakhoul *et al.*, 2016) (a partir de agora, quando se citar amônio refere-se a ambas as formas protonada NH_4^+ e/ou não protonada NH_3 , quando se citar amônia refere-se especificamente a forma desprotonada NH_3).

A AmtB de *E. coli* é uma proteína trimérica e cada homotrímero possui 11 hélices transmembrana que constituem um canal de amônio por subunidade (Coutts *et al.*, 2002). Em *E. coli* e na maioria das proteobactérias o gene *amtB* é co-transcrito com *glnK*, indicando a associação funcional entre seus produtos gênicos AmtB e GlnK, respectivamente (Thoamas *et al.*, 2000; Coutts *et al.*, 2002; Tremblay *et al.*, 2007). Sob condições limitantes de nitrogênio, os genes *glnK* e *amtB* são expressos devido a ativação do sistema Ntr por GlnB. A AmtB vai para membrana e realiza sua função de absorção de amônio pelo canal (van Heeswijk, Westerhoff & Boogerd, 2013). Quando, por sua vez, em caso de disponibilidade excessiva de amônio, os níveis de glutamina sobem e os de 2-OG diminuem favorecendo a interação de GlnK com AmtB. A interação GlnK-AmtB inibe a absorção de amônio por AmtB de forma dependente de ADP e do estado não uridililado de GlnK. Por sua vez, a formação do complexo AmtB-GlnK é negativamente sensível a presença de 2-OG e ATP (Durand *et al.*, 2006; Radchenko *et al.*, 2010, Huergo *et al.*, 2010; Javelle *et al.*, 2004; Javelle *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2011; Conroy *et al.*, 2007).

A interação AmtB-GlnK de *E. coli* (Figura 8) ocorre sob estequiometria de 3:3 monômeros. A GlnK encontra-se no lado citosólico interagindo com AmtB imersa na membrana celular, com a porção N-terminal de AmtB voltada para o lado externo. A interface de interação entre AmtB e GlnK envolve resíduos da porção C-terminal de AmtB, exposta ao citosol, e a regiões do *loop-T* de GlnK. Os *loops-T* se posicionam internalizando-se nos poros de absorção de amônio da proteína AmtB. Estudos mutagênicos indicam que a formação do complexo AmtB-GlnK parece ser sensível a pequenas modificações de aminoácidos (Severi, Javelle & Merrick, 2006; Conroy *et al.*, 2007) e na

estrutura de cristal do complexo o resíduo R47 na ponta do *loop*-T de GlnK forma ponte de hidrogênio com os resíduos C312 e S263 de AmtB, fechando o poro (Conroy *et al.*, 2007).

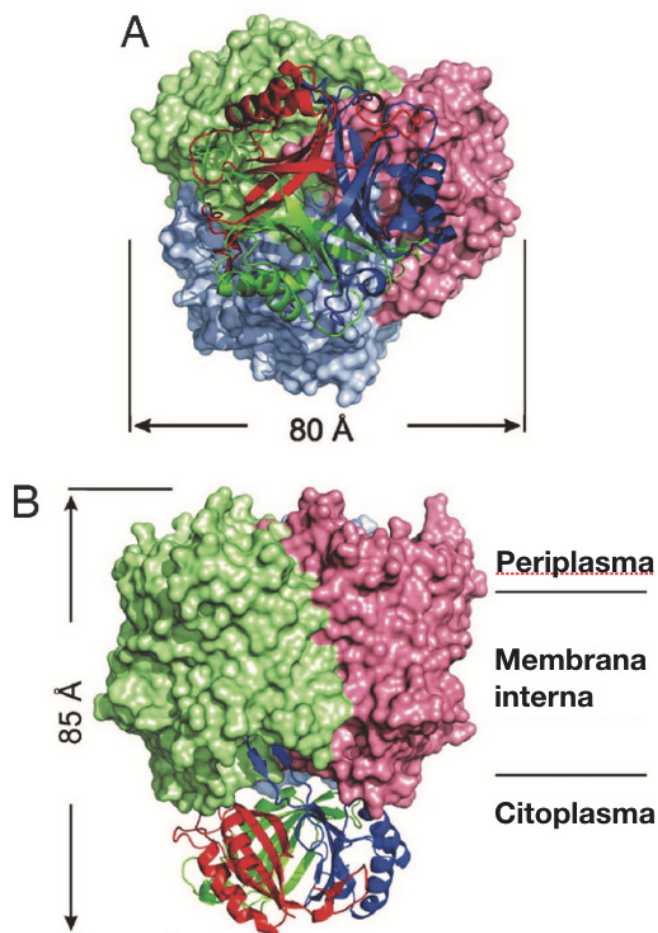


FIGURA 8 – Estrutura geral do complexo AmtB-GlnK de *E. coli*. A: Vista superficial do complexo; B: Vista lateral do complexo. FONTE: Conroy *et al.*, 2007.

2.2.4.2 Interação GlnB-ATase

Outra proteína alvo de PII envolvida no sistema regulatório de nitrogênio de *E. coli* é a ATase. A ATase, também chamada de GlnE, tem seu gene, *glnE*, expresso de forma constitutiva e é uma proteína atuante no sistema de assimilação de amônia, regulando a atividade da enzima GS.

Quando sob condições insuficientes de nitrogênio, os níveis de 2-OG são altos e os de glutamina são baixos, esses níveis desencadeiam na desuridililação de GlnB, pela atividade de GlnD. GlnB então interage com NtrB, ativando NtrC, que consequentemente ativa a transcrição de genes dependentes de σ^N . O sistema GS/GOGAT é o sistema responsável pela modificação dos níveis de glutamina e 2-OG na célula. A enzima GS, cujo gene codificante (*glnA*) é transcrito de forma aumentada sob condições limitantes de nitrogênio em *E. coli* (Merrick & Edwards, 1995; Reitzer, 2003; Amon *et al.*, 2010), é um homo-dodecâmero formado por monômeros de 52kDa cada, que

formam uma estrutura em forma de dois anéis hexagonais sobrepostos, com 12 sítios ativos (Eisenberg *et al.*, 2000). Esta enzima, sob condições limitantes de nitrogênio, catalisa a assimilação da amônia pela condensação dessa molécula ao glutamato, formando glutamina, ao passo que a enzima GOGAT usa uma molécula de glutamina para condensá-la ao 2-OG e formar 2 moléculas de glutamato, as quais são utilizadas pela GS reiniciando o ciclo (van Heeswijk, Westerhoff & Boogerd, 2013). No entanto, para que a GS seja apta a catálise, ela precisa ser ativada pela remoção de um grupamento AMP ligado covalentemente ao resíduo Ty397 de cada monômero, essa remoção é catalisada pela enzima ATase (Reitzer, 2003).

A ATase é uma enzima bifuncional, capaz de adicionar e também de remover um grupo AMP do resíduo de Tyr397 da GS. O sinal para a adenilação ou deadenilação de GS é dado pela direta interação com GlnB. Quando sob condição limitante de nitrogênio, GlnB é uridililada pela GlnD. Por conseguinte, a GlnB-UMP₃ interage com a ATase a qual tem então sua atividade removedora de AMP (AR) induzida, e com isso a GS é deadenilada e ativada. Por outro lado, quando sob suficientes condições de nitrogênio, GlnB é desuridilada, e assim, a GlnB não modificada interage com ATase, que desta vez, induz a atividade adenililtransferase (AT) desta enzima, assim, a GS é adenilada e, com isso, inativada (Ninfa & Atkinson, 2000; Reitzer, 2003) (Figura 9).

Contudo, há ainda outros elementos regulatórios das interações ente GlnB e ATase conhecidos, como a ligação de glutamina, quando em alta concentração, na porção C-terminal da

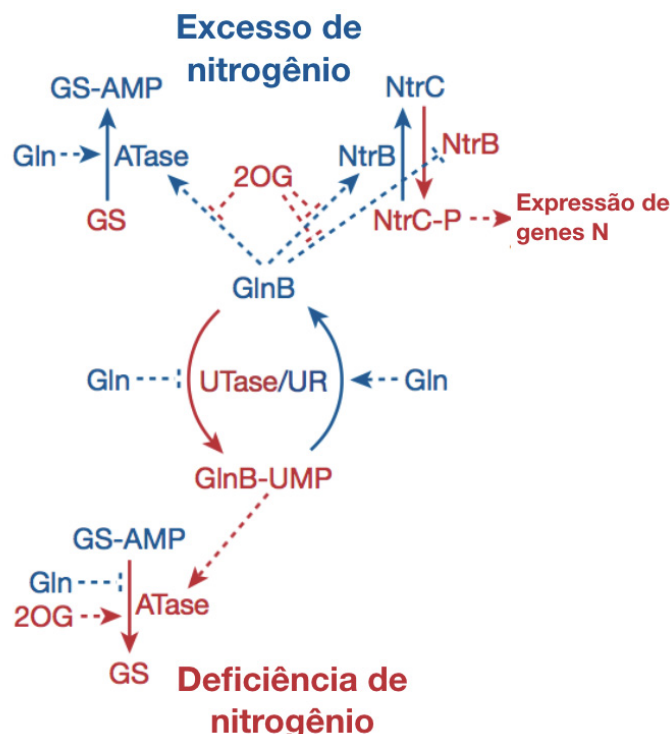


FIGURA 9 – Sistema de regulação da GS em *E. coli*. Cor azul indica evento decorrente de excesso de nitrogênio e cor vermelha representa evento decorrente de deficiência de nitrogênio. Linhas contínuas indicam modificação pós-traducional covalente e linhas pontilhadas indicam efeito alostérico. Flechas com pontas representam ativação e flechas com pontas cegas representam inibição. FONTE: Leigh & Dodsworth, 2007.

ATase, o que estabiliza o complexo GlnB-ATase (Jiang & Ninfa, 2007). Além disso, o 2-OG parece ser importante para controlar a interação de GlnB com ATase (Jiang *et al.*, 1998; Shapiro, 1969).

As proteínas PII interagem com seus alvos de forma específica e também de forma sobreposta, de tal modo que, em *E. coli*, GlnK também interage com ATase, mas GlnB parece ser mais efetiva *in vitro* (van Heeswijk *et al.*, 1996, van Heeswijk *et al.*, 2000; Atkinson & Ninfa, 1998; Atkinson e Ninfa, 1999) e GlnB também interage com AmtB em mutantes *glnK* (Coutts *et al.*, 2002). Esta possibilidade de sobreposição funcional entre as proteínas PII é entendida, não somente como provindo de um resquício funcional resultante da duplicação gênica ancestral, mas sim como um mecanismo de refinamento regulatório para as funções que desempenham.

2.2.4.3 Outras interações PII/proteínas-alvo

No curso da evolução, as proteínas PII têm adotado variadas funções regulatórias dentro do metabolismo de nitrogênio, carbono e energia em diversos organismos atuando por meio da interação proteína-proteína. As proteínas PII têm regulado, por interação física direta, proteínas transportadoras de membrana, enzimas regulatórias e fatores de transcrição, e acredita-se que o número de proteínas-alvo de PII ainda não é totalmente conhecido (Huergo, Chandra & Merrick, 2012; Forchhammer, 2008). As proteínas PII possuem alguns alvos bem estabelecidos em outros organismos, como as proteínas DraT e DraG em diazotrofos, como *R. rubrum* (Zhang *et al.*, 2001), *A. brasilense* (Klassen *et al.*, 2001, 2005; Huergo *et al.*, 2005; Huergo *et al.*, 2006), *R. capsulatus* (Drepper *et al.*, 2003) e *Azoarcus sp.* (Martin & Reinhold-Hurek, 2002). As proteínas DraT e DraG estão envolvidas com regulação pós-traducional da enzima nitrogenase, enzima capaz de fixar nitrogênio atmosférico. Um alvo bem conhecido e estudado de PII é a proteína NAGK que catalisa etapa irreversível da biossíntese de arginina em cianobactérias e plantas. Em cianobactérias, também podemos citar a proteína Pip-X, que interage com PII a fins de controle transcricional de genes do metabolismo de nitrogênio (Forchhammer, 2008). Um fator de transcrição que é alvo de interação com PII é a TnrA em *Bacillus subtilis* (Kayumov *et al.*, 2011).

Um alvo bastante interessante de PII, que foi descrito primeiramente em *A. thaliana*, é a proteína BCCP (Feria Bourrellier *et al.*, 2010). A proteína BCCP é uma subunidade da enzima acetil-CoA carboxilase que catalisa a primeira e irreversível etapa da síntese de ácidos graxos, uma das vias mais amplamente distribuídas na natureza (Waldrop & Cronan, 2002). Feria Bourrellier *et al.*, 2010, verificaram que PII interagiu com BCCP *in vitro* de forma dependente de MgATP e que essa interação resulta em parcial inibição da atividade da acetil-CoA carboxilase (ACC), em cerca de 50% e que tal inibição era revertida na presença de 2-OG, oxaloacetato e piruvato e que 2-OG reverte a inibição de forma dose dependente. Em nosso trabalho anterior, esses dados foram confirmados também nas

bactérias *E. coli* e *A. brasilense*, pela caracterização *in vitro* da interação entre GlnK e BCCP (Rodrigues *et al.*, 2014). Foi mostrado que BCCP somente interage com GlnK se biotinilada, uma vez que BCCP requer essa coenzima para seu papel no complexo ACC. A interação entre GlnK e BCCP ocorre de forma dose dependente de MgATP e essa interação é desfavorecida por uridililação de GlnK e por 2-OG de forma dose dependente. Não observamos efeito de oxaloacetato ou piruvato, nem foi observado efeito na atividade da ACC na presença de GlnK (Rodrigues *et al.*, 2014).

No presente trabalho, foi dedicado a caracterização da interação entre GlnB e BCCP de *E. coli in vitro* e a identificação de um fenótipo resultante dessa possível interação. O estudo das funções regulatórias de PII abrangem mecanismos-chave em vias metabólicas importantes para o balanço de nitrogênio, carbono e energia na célula. O envolvimento das proteínas PII no controle de uma via relacionada diretamente ao metabolismo de carbono demonstra fortemente o quão essas proteínas podem ser importantes e diversificadas funcionalmente.

2.3 ACETIL-CoA CARBOXILASE (ACC)

A ACC é uma enzima da família das carboxilases dependentes de biotina. Proteínas desta família são amplamente distribuídas na natureza e estão presentes em bactérias, archaeas, algas, fungos, plantas e animais realizando importantes papéis na síntese de lipídeos, aminoácidos e carboidratos (Tong, 2013). As enzimas carboxilases dependentes de biotina, em geral são engajadas em reações de fixação de CO₂, realizam a carboxilação da biotina de forma dependente de ATP e íon divalente (em geral Mg²⁺), seguida da transferência do grupo carboxil da biotina para um aceptor final, em geral um substrato ligado à coenzima A (CoA). Além da acetil-CoA carboxilase também são pertencentes a essa família a piruvato carboxilase (PC), que atua na gliconeogênese, a propionil-CoA carboxilase (PCC), atuante na oxidação de ácidos graxos de cadeia ímpar, a β-metilcrotonil-CoA carboxilase (MCC), atuante no catabolismo de aminoácidos, a ureia carboxilase (UC), que provê à microorganismos o uso de uréia como fonte de nitrogênio, e a geranil-CoA carboxilase (GCC), que está envolvida no catabolismo de isoprenóides de microorganismos e plantas (Waldrop, Holden & Maurice, 2012; Tong, 2013).

Carboxilases dependentes de biotina possuem componentes catalíticos que podem ocorrer como domínios de um polipeptídeo único ou como componentes de enzimas com múltiplas subunidades. Os componentes BCCP (proteína carreadora de carboxil-biotina), BC (biotina carboxilase) e CT (carboxiltransferase) são os domínios/subunidades responsáveis pela catálise das enzimas carboxilases dependentes de biotina. A função de BCCP é carrear seu grupo prostético biotina para o sítio ativo da BC, onde a biotina é carboxilada, de forma dependente de ATP e

bicarbonato, gerando a carboxil-biotina. BCCP então faz a translocação da carboxil-biotina para o sítio ativo da CT, onde o grupo carboxil é transferido aoceptor final da reação. No caso da ACC, o acetil-CoA é o composto aceitor do grupo carboxil, gerando malonil-CoA. A formação de malonil-CoA a partir de acetil-CoA caracteriza a primeira etapa da síntese de ácidos graxos. Esta é a etapa irreversível e limitante da via que leva a formação de acil-ACPs de cadeia longa (>12C) (Figura 10A) (Waldrop & Cronan, 2002; Tong, 2005).

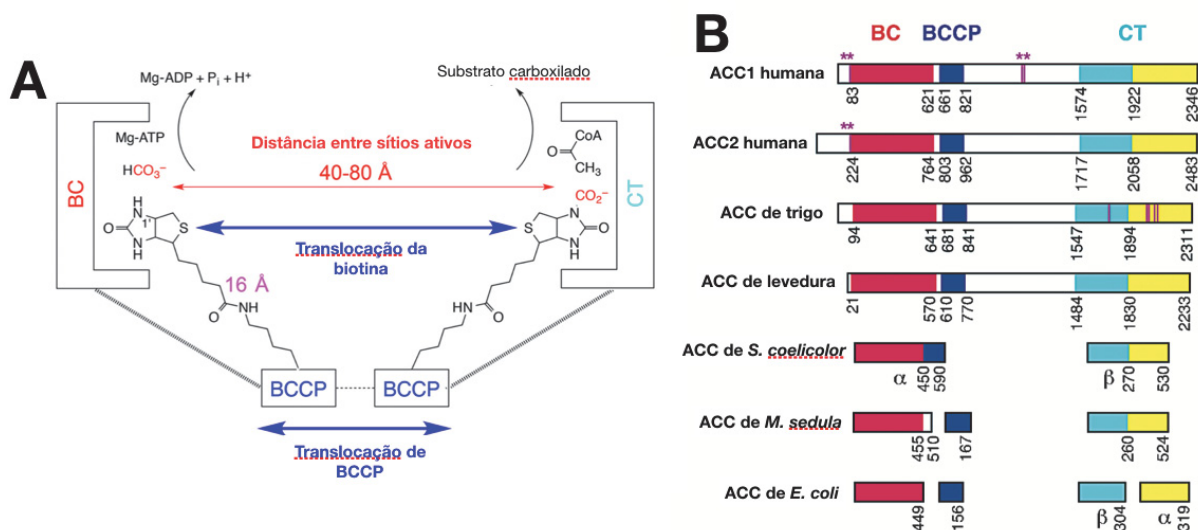


FIGURA 10 – Esquema da reação catalisada por enzimas carboxilases dependentes de biotina (A). Organização dos domínios de enzimas ACC em diversos organismos (B). A: A biotina é carboxilada no sítio ativo da BC e depois translocada para o sítio ativo da CT para possibilitar a carboxilação do acetil-CoA, formando malonil-CoA. A distância entre o átomo N9 da biotina e o resíduo de lisina de BCCP biotinilado é de 16Å. A movimentação da BCCP somado ao alcance da biotina varia de 40-80Å entre as estruturas conhecidas. B: Os domínios/subunidades estão representados conforme indicação de cores na figura. O número de resíduos de aminoácidos que compõem cada domínio/subunidade está representado. FONTE: Tong, 2013 (A), Tong, 2005 (B).

Em *E. coli* e na maioria dos seres vivos a função do malonil-CoA é prover dois carbonos para as etapas de alongamento de ácidos graxos, embora, em algumas archaeas e bactérias fotossintetizantes o malonil-CoA alimente vias autotróficas de fixação de carbono pela sua redução catalisada pela enzima malonil-CoA redutase (MCR) (Hügler *et al.*, 2002). Em eucariotos, o malonil-CoA ainda tem função regulatória da via sintética de ácidos graxos, atuando como potente inibidor da carnitina/palmitoiltransferase 1 (CPT1), prevenindo o transporte de ácidos graxos para dentro da mitocôndria para β-oxidação (McGarry & Brown, 1997; Ramsay *et al.*, 2001; Wakil & Abu-Elheiga 2009).

Em bactérias e na maioria dos cloroplastos das plantas dicotiledôneas, algas, briófitas, pteridófitas, gimnospermas e em monocotiledôneas não-gramíneas a enzima ACC ocorre de forma heteromérica. Por sua vez, a ACC ocorre como polipeptídeo de cadeia única multi-domínio no citosol de plantas, cloroplastos de plantas monocotiledôneas e em mamíferos (Waldrop, Holden & Maurice,

2012; Salie & Thelen, 2016). Há também algumas bactérias que possuem ACC sob a forma polipeptídica de cadeia única, como na actinobactéria *Mycobacterium avium* sub-espécie *paratuberculosis*, (Tran *et al.*, 2014) e formas intermediárias com domínios fundidos, como na bactéria Gram-positiva *Streptomyces coelicolor* (Figura 10B) (Tong, 2005).

Em plantas, a ACC plastidial é principalmente engajada na formação de malonil-CoA para a biossíntese de ácidos graxos de cadeia longa (>12C). Enquanto a ACC citoplasmática é importante para o metabolismo secundário, como síntese de ácidos graxos de cadeia muito longa (>C20), flavonóides, produção de ceras cuticulares e outros compostos, assim como para o desenvolvimento embrionário (Nikolau *et al.*, 2003; Chalupska *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2011). *Arabidopsis thaliana* possui duas formas parálogas de BCCP, a BCCP1 e a BCCP2, que aparentemente são co-localizados no cloroplasto (Feria Bourrellier *et al.*, 2010). Embora BCCP1 possa compensar a falta do gene *acc2* (expressa BCCP2) e BCCP2 não seja capaz de suprir a falta de *acc1* (expressa BCCP1), a qual resulta em fenótipo letal (Li *et al.*, 2011), BCCP1 e BCCP2 possuem relativa redundância funcional.

Em mamíferos há duas isoformas da ACC, a ACC1 e ACC2. Essas isoformas apresentam diferentes níveis de expressão nos tecidos de humanos e camundongos (Kreuz *et al.*, 2009). A ACC1, também conhecida como ACC α , é citosólica e catalisa a primeira, limitante e irreversível etapa da via biossintética de ácidos graxos no fígado, adipócitos e tecidos lipogênicos. Há uma segunda isoforma de ACC de mamíferos, a ACC2, também conhecida como ACC β , que possui 73% de identidade de aminoácidos com a ACC1 e é associada a membrana mitocondrial externa através do resíduo 140 N-terminal, ausente em ACC1. ACC2, embora seja ligada a membrana, possui sua maior porção exposta ao citosol, seus primeiros 20 resíduos de aminoácidos são altamente hidrofóbicos e sua expressão ocorre principalmente nos tecidos musculares e coração, assim como no fígado (Abu-Elheiga *et al.*, 2000; Tong, 2013).

Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, por sua vez, além da ACC1 citosólica, há ainda uma forma mitocondrial desta enzima, chamada de HFA1, que é muito importante para o crescimento em lactato ou glicerol como fonte de carbono, assim como para a biossíntese de ácidos graxos nesta organela (Hoja *et al.*, 2004; Hiltunen *et al.*, 2010). Contudo, essa isoforma é somente encontrada em *S. cerevisiae*, embora, também já tenha sido relatada atividade da ACC em mitocôndrias de plantas. Em mitocôndrias de outros organismos o malonil-CoA é produzido pela malonil-CoA sintetase (Witkowski *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2011).

2.3.1 Características estruturais dos componentes da acetil-CoA carboxilase (ACC)

2.3.1.1 Biotina carboxilase (BC)

A primeira estrutura da subunidade BC de *E. coli* foi publicada em 1994 (Waldrop *et al.*, 1994). Atualmente há diversas estruturas disponíveis de BC de eucarioto e procarioto (Tong, 2013). A BC de *E. coli* é uma proteína homodimérica em que cada monômero é constituído por 449 resíduos de aminoácidos (49,4 kDa). A BC possui três domínios por monômero, o domínio A (resíduos 1-103), B (131-203) e C (208-449). Os domínios A e C, formam uma estrutura globular e ambos são encontrados em proteínas da família biotina carboxilase. A proteína biotina carboxilase (BC) da o

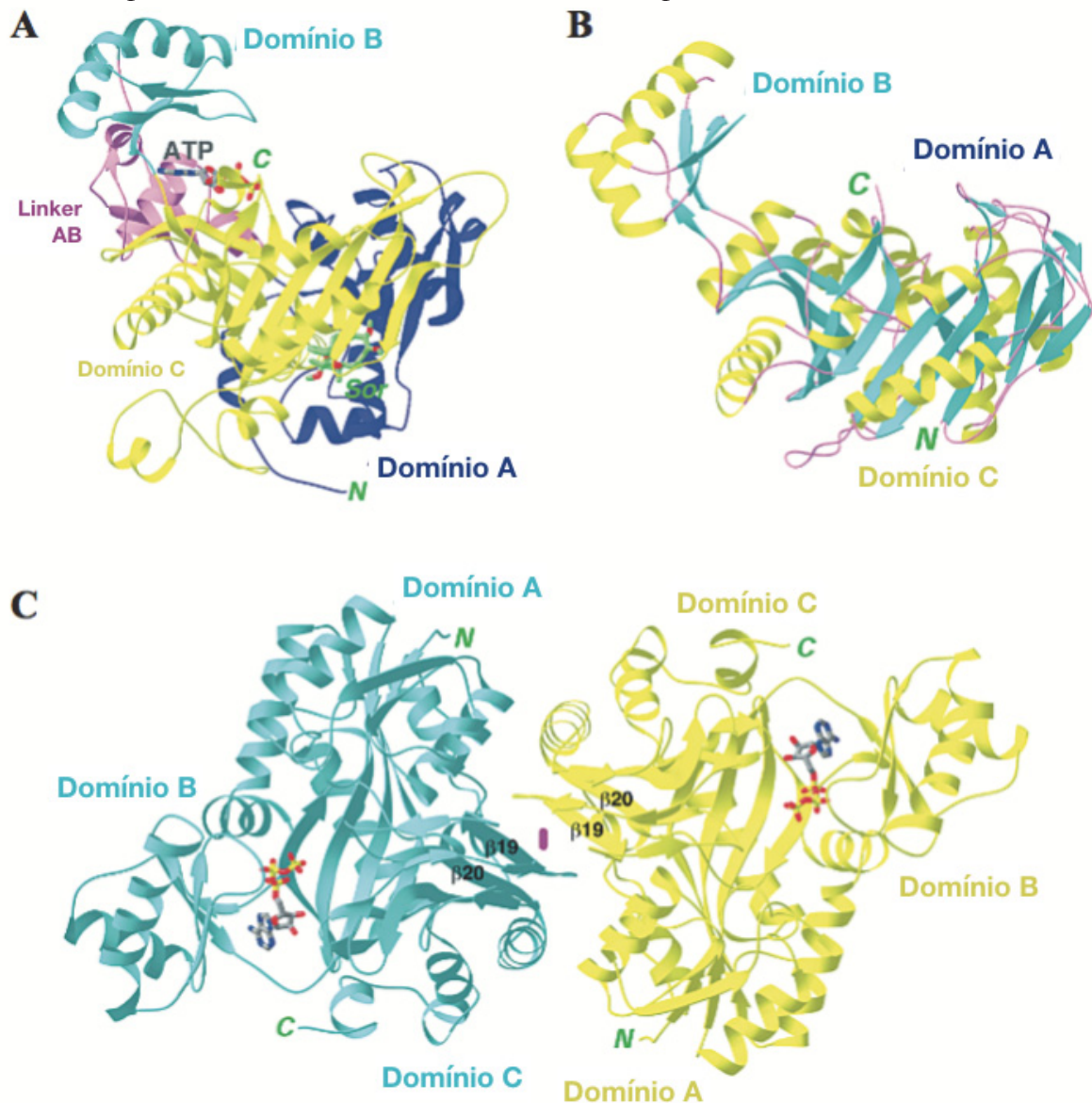


FIGURA 11 – Estrutura geral da biotina carboxilase (BC). A: Estrutura da BC de levedura ligada a um inibidor Sorafeno, representado em verde, e ligado a ATP, tal como a BC de *E. coli* (C). Nota-se que o domínio B está localizado longe do resto da estrutura. B: Estrutura do monômero de BC de *E. coli* em sua conformação “aberta”. C: Estrutura do dímero de BC de *E. coli*. A posição onde está o ATP está indicada. FONTE: Tong, 2005.

nome à esta família das proteínas biotina carboxilases e é modelo representativo estruturalmente desta família (pfam). O domínio B, por sua vez, é encontrado em proteínas da família das carbamoil-fosfatase sintases, as quais catalisam reação em que o ATP é usado para ativar o bicarbonato em ataque a amônia, glutamina ou, como no caso da BC da ACC, a biotina (Cronan & Waldrop, 2002).

O domínio A é composto por cinco folhas β -pregueadas paralelas flanqueadas por ambos os lados pelo total de quatro α -hélices (Waldrop *et al.*, 1994). O domínio B é uma porção muito flexível da proteína que se estende para fora da porção globular, dobrando-se em duas cadeias do tipo α -hélice e três cadeias- β (Thoden *et al.*, 2000). O domínio C, juntamente com o domínio A, compõe a porção globular da proteína e possui uma folha- β formada por oito cadeias- β anti-paralelas e outra formada por três cadeias- β menores anti-paralelas e sete α -hélices (Figura 11) (Waldrop *et al.*, 1994). O sítio ativo de BC é formado por resíduos compartilhados dos domínios A e C. O domínio B sofre uma drástica mudança conformacional para fechar o sítio catalítico durante a catálise, acarretando em duas formas gerais estruturais desta proteína, a estrutura aberta e fechada de BC.

A ligação do ATP induz rearranjo estrutural, de conformação aberta para fechada, que reflete no giro do domínio B de $\sim 45^\circ\text{C}$ para dentro da estrutura (Waldrop *et al.*, 1994; Thoden *et al.*, 2000; Mochalkin *et al.*, 2008; Chou *et al.*, 2009). A BC eucariótica, por sua vez, é bastante semelhante mas possui seguimentos inseridos em sua sequência, principalmente entre os sub-domínios A e B (AB linker), o que torna, assim, o domínio BC de eucarioto (~ 550 resíduos) maior que a subunidade BC bacteriana (~ 450 resíduos) (Shen *et al.*, 2004).

BC catalisa a carboxilação da biotina pela desprotonação do bicarbonato e ataque ao fosfato- γ do ATP, gerando ADP e um carboxifosfato. A decomposição deste intermediário produz fosfato inorgânico e CO_2 . Em seguida, o átomo N1 da biotina é desprotonado por um óxido de fosfato, possibilitando o ataque de um CO_2 a este átomo, gerando a carboxil-biotina-BCCP. Depois disso a reação segue pela translocação da carboxil-biotina para o sítio ativo da CT, onde a descarboxilação da biotina ocorre e o CO_2 é transferido para o acetil-CoA, gerando, malonil-CoA (Tong, 2005). Em *E. coli*, o resíduo que extrai o próton do bicarbonato é o de Glu296, iniciando o ataque nucleofílico ao ATP. O intermediário carboxil-fosfato é decomposto a CO_2 e ortofosfato (PO_4^{-3}), este extrai o próton do átomo N1 da biotina, então o resíduo de Arg338 estabiliza a biotina-enolato resultante para a reação de carboxilação. Por fim, o ataque ao átomo N1 por CO_2 leva a formação da carboxil-biotina. Estes resíduos conservados atuam provavelmente da mesma forma em outras enzimas biotina carboxilases (Knowles, 1989; Chou *et al.*, 2009).

O sítio de ligação do ATP em BC de *E. coli* pode ser dividido em 3 diferentes regiões (Figura 12), à região de ligação da adenina (1), a região de ligação da ribose (2) e a região de ligação do grupo fosfato (3). A região de ligação da adenina abrange aos resíduos dos aminoácidos E201, K202, L204, I157-K159, L278 e I287. A região de ligação da ribose é composta pelos resíduos H209, Q233, H236

e H438. E na região de ligação dos fosfatos estão envolvidos os resíduos K116, K159 e o *loop* rico em glicina formado pelos resíduos 161 a 168 (Waldrop *et al.*, 1994; Thoden *et al.*, 2000; Mochalkin *et al.*, 2008; Chou *et al.*, 2009). Esses resíduos de BC são conservados em várias espécies de bactérias.

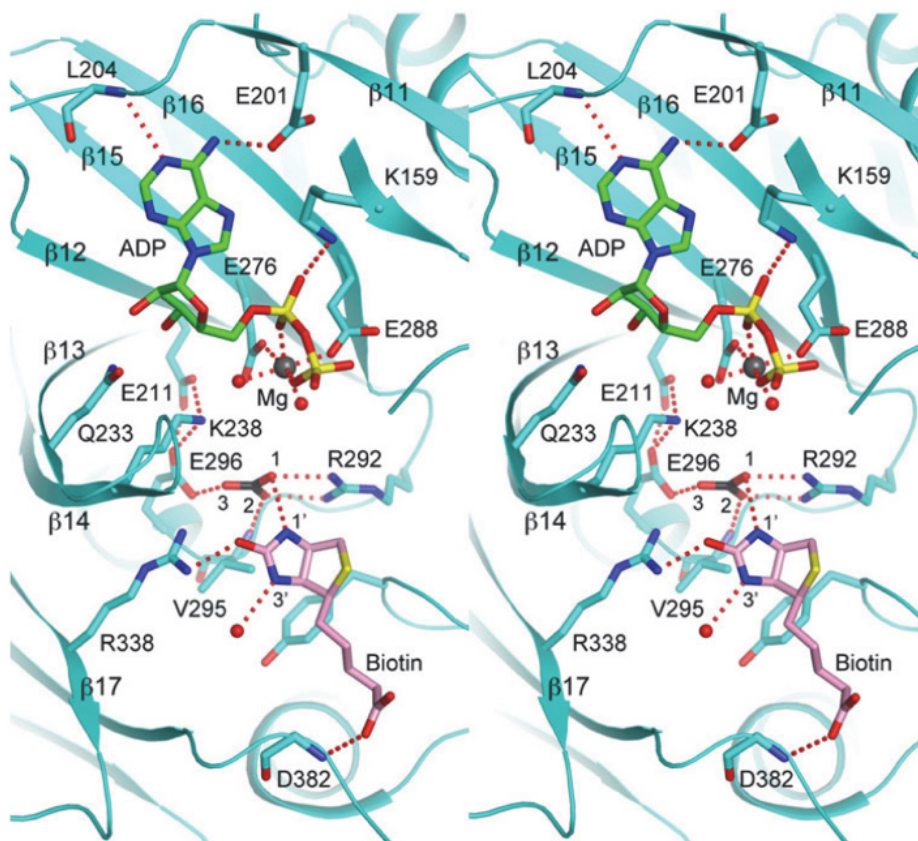


FIGURA 12 – Sítio ativo da biotina carboxilase (BC) de *E. coli*. As moléculas de MgATP, bicarbonato e biotina estão representadas em bastões predominantemente verde, preto e rosa, respectivamente. Vários segmentos da proteína estão omitidos. Pontes de H estão representadas em linhas pontilhadas. FONTE: Tong, 2013.

BC é uma proteína dimérica e os sítios ativos de cada monômero parecem ser independentes um do outro para a formação do motivo catalítico, por estarem distantes na interface dimérica, no entanto, a dimerização é importante para prover relevante atividade (Janiyani *et al.*, 2001), a qual ocorre de forma alternada nos sítios ativos, em um ciclo catalítico que funciona por mecanismo “flip-flop” (Mochalkin *et al.*, 2008). A interface de ligação entre seus monômeros se dá pela interação iônica dos resíduos Arg19 and Glu23 de um monômero com Glu408 a Arg401 do outro monômero, respectivamente (Mochalkin, 2008; Chou, *et al.*, 2009; Chou e Tong, 2011).

Os resíduos de aminoácidos importantes para interagir com o bicarbonato são o R292, o V295 e o E296, que interagem com os átomos de oxigênio 1, 2 e 3 do bicarbonato respectivamente. Por sua vez os resíduos Y82, V295 e R338 parecem ser importantes para a interação da biotina com o sítio

ativo da BC. O íon magnésio está em interação com os resíduos E276 e E288 na estrutura de cristal de BC na presença de MgADP (Chou *et al.*, 2009).

2.3.1.2 Proteína carreadora de carboxil-biotina (BCCP)

BCCP é o componente catalítico da ACC responsável por carrear a biotina ao sítio ativo da BC para carboxilação e consecutivamente translocar a carboxil-biotina formada para o sítio ativo da CT, onde ocorre a transferência do grupo carboxil da biotina para o acetil-CoA, formando malonil-CoA (Waldrop & Cronan, 2002). Em *E. coli*, BCCP é constituída por 156 resíduos de aminoácidos (~16,7 kDa) cujo nível de conservação é limitado, exceto pela região C-terminal onde há um domínio bastante conservado, o domínio biotinoil, presente em proteínas que possuem a biotina como coenzima. Em BCCP de *E. coli*, o domínio biotinoil abrange os resíduos de aminoácidos 81-155 (pfam) (Figura 13B). Este domínio possui homologia estrutural com domínios lipoil encontrados em enzimas que recebem o ácido lipóico como coenzima. A biotina ou ácido lipóico são covalentemente ligados a um resíduo de lisina. As proteínas que utilizam a biotina como coenzima possuem atividade de carboxilases, enquanto as enzimas que usam o ácido lipóico realizam atividade de lipoamida aciltransferase, como a 2-oxoglutarato deshidrogenase, piruvato deshidrogenase e complexo BCKDK (Cronan, 2008).

O sítio de biotinilação das proteínas carboxilases dependentes de biotina é um motivo conservado constituído pelos resíduos (Ala/Val)-Met-Lys-(Met/Leu) (Cronan & Waldrop, 2002; Nikolau *et al.*, 2003). A modificação pós-traducional que sofre BCCP de *E. coli* pela ligação da biotina se dá no resíduo K122. Em *E. coli*, BCCP é a única proteína biotinilada e sua biotinilação é catalisada pela enzima BirA, também chamada de proteína biotina ligase (BPL) (Chapman-Smith e Cronan, 1999b). A BirA de *E. coli* é uma proteína monomérica de 35 kDa que possui estrutura tridimensional já determinada (Wilson *et al.*, 1992; Weaver *et al.*, 2001; Wood *et al.*, 2006; Eginton *et al.*, 2015). A reação de biotinilação ocorre em duas etapas, primeiro, a BirA catalisa o ataque do oxigênio carboxilato da biotina no fosfato α do ATP, formando pirofosfato e biotinoil-AMP, também chamado de biotinoil-adenilato. Então o grupo ϵ -amino do resíduo de lisina 122 da BCCP é atacado nucleofilicamente pelo átomo do carbono anidrido formado, liberando o AMP e, assim, formando a ligação amida que une covalentemente a biotina à BCCP (Lane *et al.*, 1964; Chapman-Smith e Cronan, 1999b). Sabe-se que 100% de BCCP nativa é biotinilada *in vivo* (Fall & Vagelos, 1972; Cronan *et al.*, 1989), no entanto, quanto sob super-expressão de BCCP recombinante, somente 20-30% é biotinilada (Li & Cronan, 1993), mesmo sob super-expressão de biotina ligase (Cronan *et al.*, 1989).

Estruturalmente, a BCCP tem conhecida apenas a região C-terminal em *E. coli*. Essa porção de BCCP foi resolvida por difração de raio-X (Athappilly & Hendrickson, 1995) e por RMN (Yao *et al.*, 1997; Roberts *et al.*, 1999). A porção N-terminal de *E. coli* não é conhecida estruturalmente até

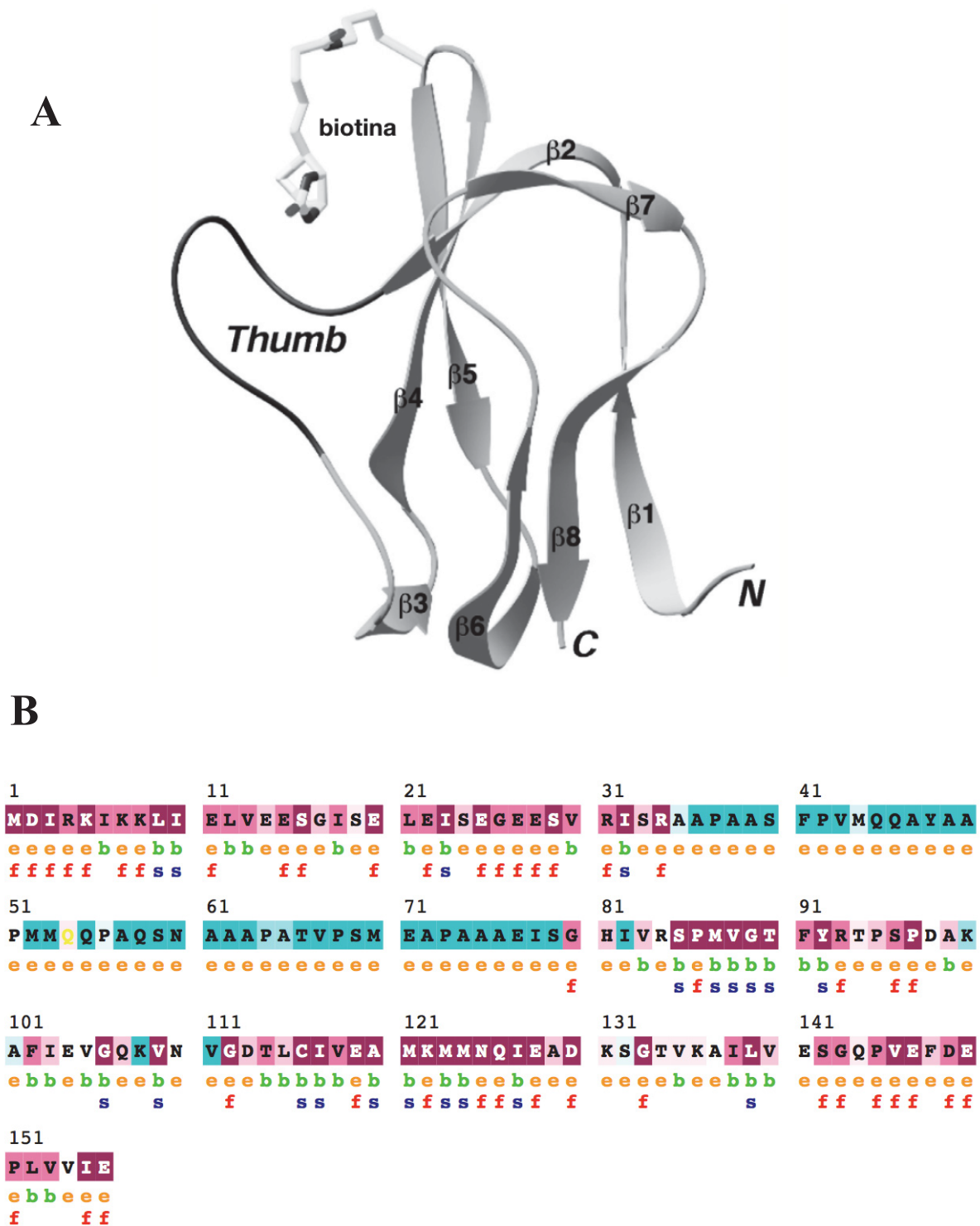


FIGURA 13 – **A-Estrutura da porção C-terminal da BCCP de *E. coli*.** A biotina está representada (Holo-BCCP). Está indicado também a característica região *Thumb*. FONTE: Tong, 2005 **B- Análise de sequência de aminoácidos de BCCP.** Nível de conservação de aminoácidos determinado por alinhamento múltiplo de sequência (MAFFT) e predição funcional de aminoácidos por algoritmo ConSurf. Escala crescente de conservação de aminoácido: 1 2 3 4 5 6 7 8 9. e – Resíduo exposto. b – Resíduo oculto. f – Resíduo funcionalmente importante (altamente conservado e exposto). s – Resíduo estruturalmente importante (altamente conservado e oculto). x – Dados insuficientes.

o momento, pois fatores físico-químicos intrínsecos da sequência de aminoácidos de BCCP desfavorecem a cristalização desta proteína (Tong, 2013). Além disso, BCCP possui uma região central rica em prolina-arginina a qual se acredita proporcionar alta mobilidade a proteína, o que pode também desfavorecer a determinação de sua estrutura (Cronan e Waldrop, 2002).

A porção C-terminal de BCCP de *E. coli* é resistente a ação proteolítica de diversas enzimas, característica conferida evolutivamente a algumas regiões conservadas e essenciais de algumas proteínas. Quando submetida a proteólise limitada com subtilisina, BCCP gera um polipeptídeo de 71 resíduos de aminoácidos C-terminais. Esse polipeptídeo foi resolvido estruturalmente por cristalografia de raio-X (Figura 13A), revelando uma estrutura β -sanduíche do domínio biotinoil, flanqueadas por dois conjuntos de quatro cadeias- β antiparalelas, $\beta 1$, $\beta 6$ e $\beta 8$ de um lado e $\beta 2$, $\beta 4$ e $\beta 5$ de outro (Athappilly & Hendrickson, 1995). A estrutura da região C-terminal de BCCP é estabilizada por um núcleo de resíduos hidrofóbicos. A hidrofobicidade conservada é característica de proteínas com domínio lipoil. Os resíduos formadores desse núcleo são provavelmente importantes determinantes estruturais. O resíduo único de cisteína 116 está entre os aminoácidos desse núcleo hidrofóbico, internalizado na estrutura (Athappilly & Hendrickson, 1995; Yao *et al.*, 1997; Roberts *et al.*, 1999).

Na porção C-terminal da BCCP de *E. coli* há dois motivos estruturais importantes, a β -hairpin turn localizada entre as cadeias $\beta 4$ e $\beta 5$, e a thumb, uma protuberância estrutural exposta a superfície de BCCP formada pelos resíduos 93 a 102. É em β -hairpin turn que há o sítio de biotinilação de sequência AMKM na qual o resíduo de lisina 122 é o que recebe a biotina covalentemente por meio da ação enzimática de BirA. A região thumb é um motivo estrutural somente encontrado na BCCP de bactéria (Figura 14). Estudos com proteína BCCP mutante para a região thumb mostraram perda de crescimento em cultura (Solbiati *et al.*, 2002). Além disso, na apo-BCCP de *E. coli*, thumb possui maior flexibilidade do que na holo-BCCP, em que seus resíduos 95-100 interagem com a biotina estabilizando thumb e a estrutura global de BCCP. (Yao *et al.*, 1999; Roberts *et al.*, 1999). A energia final do arranjo estrutural calculado para a apo-BCCP (-241 kJ/mol) é significativamente menor do que a da holo-BCCP (-507 kJ/mol), indicando o mais baixo grau de estabilidade da BCCP não ligada à biotina (Roberts *et al.*, 1999). A estrutura da porção C-terminal de BCCP determinada por difração de raio-X tem a biotina estabilizando o motivo thumb pela formação de duas pontes de hidrogênio entre o anel uriedo da biotina e a cadeia lateral da treonina 94 da estrutura thumb. A estrutura do domínio BCCP da ACC eucariótica também é desestabilizada pela ausência de biotinilação (Wei & Tong, 2015). No entanto, em análise comparativa das estruturas da BCCP biotinilada e não-biotinilada de *E. coli* por RMN não se detectou considerável alteração conformacional causada por biotina ou sua ausência, nem a ligação por ponte de hidrogênio da biotina a qualquer resíduo de BCCP

(Solbiati *et al.*, 2002). Os autores defendem que tais pontes de hidrogênio descritas na estrutura de Athappilly & Hendrickson (1995) são irrelevantes para a estrutura de BCCP e que podem ser artefatos do estado cristalino da proteína. Além disso, a Thr94 não é um resíduo conservado em outras BCCPs e uma das pontes de hidrogênio mostradas na estrutura de cristal de BCCP, ocorre no N1-H do anel da biotina, o exato local onde o grupo carboxil é adicionado por BC, assim, tal ligação deveria ser quebrada de alguma forma para prosseguimento da reação da ACC. Nessa abordagem, a dependência estrutural de BCCP para com a biotina poderia ser um entrave catalítico e a biotina livre saturante teria maior atividade que a ligada à BCCP, o que sabidamente não ocorre (Solbiati *et al.*, 2002).

A avidina tetramérica liga-se a biotina com constante de afinidade (K_d) de $10^{-14}M$, o menor K_d para ligação não-covalente encontrado na natureza (Grenn, 1975). Em ensaios de co-purificação de BC-BCCP em cromatografia de afinidade à avidina, co-expressando BC e BCCP a partir de um mesmo plasmídeo sob controle de regiões RBS e promotora nativa do operon *accBC*, que expressa BC e BCCP, foi verificada estequiometria de um dímero de BC para quatro moléculas de BCCP $(BC)_2(BCCP)_4$ (Choi-Rhee & Cronan, 2003). Além disso, a porção N-terminal de BCCP é de fundamental importância para a interação entre BCCP e BC, pois construções contendo pequenas deleções de aminoácidos da região N-terminal de BCCP ($\Delta 2-5$, $\Delta 5-9$, $\Delta 10-13$, $\Delta 14-16$, $\Delta 17-19$, $\Delta 20-22$, $\Delta 23-25$, $\Delta 30-32$) perderam capacidade de interação com BC em ensaios de co-purificação usando afinidade de holo-BCCP à coluna de avidina (Choi-Rhee & Cronan, 2003). No entanto, alguns dados estruturais de Broussard *et al.* (2013) se mostram contrários à estequiometria BC-BCCP e quanto a interface de interação do complexo sugerida por Choi-Rhee *et al.* (2003).

O complexo BC-BCCP purificado após co-superexpressão, em *E. coli*, formou cristal sob a forma de dois dímeros de BC para 4 monômeros de BCCP, uma proporção de 1:1. Difração desses cristais não possibilitou obter a estrutura da porção N-terminal de BCCP, somente da C-terminal a qual estava em interação com BC (Broussard *et al.*, 2013), contrariando dados anteriores sobre porção de BCCP que media interação com BC (Choi-Rhee *et al.*, 2003). A região *thumb* de BCCP apresentou-se exposta, voltada para o solvente e a região β -*hairpin turn* em parte em interação com BC e em parte exposta (Broussard *et al.*, 2013).

A interação do domínio C-terminal da BCCP com BC, revelada por difração de raio-X, se dá pela formação de ponte de hidrogênio entre o grupo carbonila do resíduo Cys50 de BC com grupamento NH do resíduo Phe148 de BCCP. Ainda na porção N-terminal de BC, outra ponte de hidrogênio é formada pelo grupo NH de Cys50 de BC com grupo carboxila de Glu147. As cadeias laterais do resíduo His32 e Thr48 de BC interagem com o grupo carboxil da Glu147 de BCCP por meio de uma molécula de água. Mutação pontual no resíduo Glu147 de BCCP com região N-terminal deletada mostra queda de atividade de 3x (Chapman-Smith *et al.*, 1999a). Além disso, compondo a

interface de interação BC-BCCP se tem o resíduo Asp149 de BCCP interagindo com o Tyr380 de BC (Broussard *et al.*, 2013).

Apesar de os dados estruturais obtidos por difração raio-X de cristal do complexo BC-BCCP de *E. coli* apresentar estequiometria 1:1 (monômeros), a estequiometria 2:1 de BCCP:BC é ainda fortemente defendida por Smith e Cronan (2014), com base em diversos experimentos realizados (Ishihama *et al.*, 2008; Kuntumalla *et al.*, 2009; Choi-Rhee & Cronan, 2003; Smith & Cronan, 2014). Além disso, a porção de BCCP importante para interação com BC é tida como sendo a N-terminal (Choi-Rhee & Cronan, 2003), porção essa ausente na estrutura proposta do complexo BCCP-BC (Broussard *et al.*, 2013). Tais incoerências com demais dados na literatura talvez tenham ocorrido pela forma ortodoxa pela qual foi obtido cristal do complexo BC-BCCP, usando-se proteínas agregadas, de acordo com perfil cromatográfico de gel filtração apresentado no trabalho de Broussard *et al.*, (2013). Sendo assim, é concebível que as informações estruturais fornecidas pelo complexo BC-BCCP provenham de dados artefatuais, sendo necessário, por isso, mais estudos estruturais desse complexo.

Por sua vez, a estrutura do domínio BCCP de ACC2 de cadeia única de humano (hACC2) possui estrutura similar a subunidade BCCP bacteriana, exceto pela estrutura *thumb*, presente apenas em procariotos (Tong, 2013) (Figura 14). A estrutura do sub-domínio biotinoil da hACC2 (resíduos 891-964) foi estruturalmente determinada por RMN e apresentou estrutura globular formada por duas

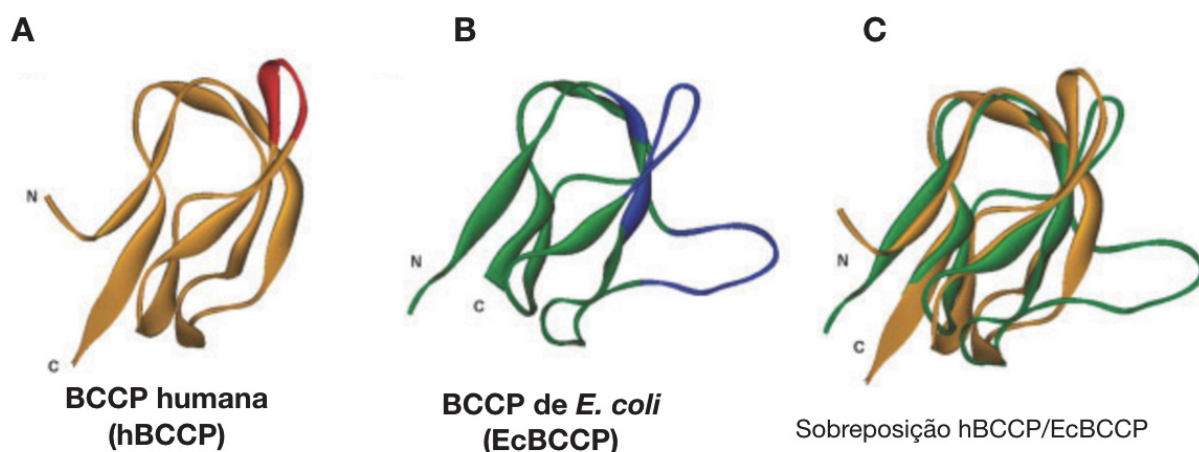


FIGURA 14 – Comparação estrutural dos domínios biotinoil da BCCP humana e de *E. coli*. **A:** Em amarelo se tem o segmento do domínio BCCP da ACC2 humana. **B:** Em verde se tem a porção C-terminal da BCCP de *E. coli*. **C:** Sobreposição entre as estruturas A e B (r.m.s.d de 3,24 Å), onde percebe-se alto grau de similaridade, exceto pela região *thumb*. FONTE: Lee *et al.*, 2008.

camadas de 4 cadeias- β pregueadas, conectadas por um pequeno *loop* e *loops* que circundam um núcleo hidrofóbico e essas 8 cadeias- β estão dispostas de forma muito similar em *E. coli*. No domínio

BCCP de hACC2, a biotina ligada covalentemente no resíduo Lys929 não apresentou interação com nenhum outro resíduo de aminoácido na estrutura de RMN (Lee *et al.*, 2008). Alinhamento das sequências de aminoácidos de BCCP de *E. coli* e humano revela identidade de 27.6% e a sobreposição das estruturas de RMN apresentam 41 resíduos de aminoácidos sobrepostos, exceto os da região *thumb* (Figura 14).

2.3.1.3 Carboxiltransferase (CT)

O domínio/subunidade carboxiltransferase é encontrado em enzimas pertencentes à superfamília das crotonases. Esta família é composta por enzimas que realizam reações com tioésteres coenzima-A, como liases, oxirredutases, hidrogenases, decarboxilases, carboxiltransferases, isomerases, sintases e dehalogenases. Estruturalmente, enzimas crotonases possuem forma canônica formada por repetições $\beta\beta\alpha$, em que as duas cadeias- β ocorrem aproximadamente perpendiculares entre si e cercadas por α -hélices (Hamed *et al.*, 2008).

Crotonases podem ser multiméricas e a CT de bactéria é constituída de uma subunidade α e outra subunidade β , correspondentes aos sub-domínios C e N de eucarioto, respectivamente (Tong, 2013). Em *E. coli*, CT é uma molécula heterotetramérica ($\alpha_2\beta_2$ -dímero de dímero) cuja estrutura geral tem forma de uma pirâmide triangular truncada. A subunidade α é constituída de 319 resíduos de aminoácidos com ~35kDa e a subunidade β é constituída de 304 resíduos de aminoácidos com ~33,2 kDa e ambas são estruturalmente homólogas (Figura 15B) (Bilder *et al.*, 2006).

A CT é o componente carboxiltransferase da ACC responsável pela transferência do grupo carboxil da biotina para o acetil-CoA, formando malonil-CoA. A carboxilação do acetil-CoA por CT requer a desprotonação do grupo amida do acetil-CoA pelo átomo N1 da biotina, após liberar o grupo carboxil, formando um íon enolato do grupo acetil que então ataca o CO gerando o malonil-CoA (Hamed *et al.*, 2008; Attwood e Wallace, 2002).

As estruturas tetraméricas das CTs de *E. coli* (EcCT) e *S. aureus* (SaCT) possuem 52% de identidade de sequência e 93% de sobreposição estrutural com rmsd de 1Å e foram resolvidas com resolução de 3.2Å e 2Å, respectivamente (Bilder *et al.*, 2006). As estruturas possuem uma cavidade central que gradualmente se abre de 13Å para 23Å na superfície ápice da pirâmide. O complexo dimérico α e β de CT possui 4 subdomínios. O domínio HS (*helical subdomain*) 1 α e 2 α (HS1 α e HS2 α) na subunidade α , e os domínios HS1 β e domínio de Zn (motivo dedo-de-Zn) no monômero β (Figura 15). O motivo dedo-de-Zn de CT é do tipo-Cys₄, com um metal divalente coordenado em uma estrutura tetrahédrica formada pelos grupos sulfridril de 4 cisteínas (C27, C30, C46 e C49) (Bilder *et al.*, 2006). Mutação individual nesses cisteínas levam à diminuição da V_{max} da CT de *E.*

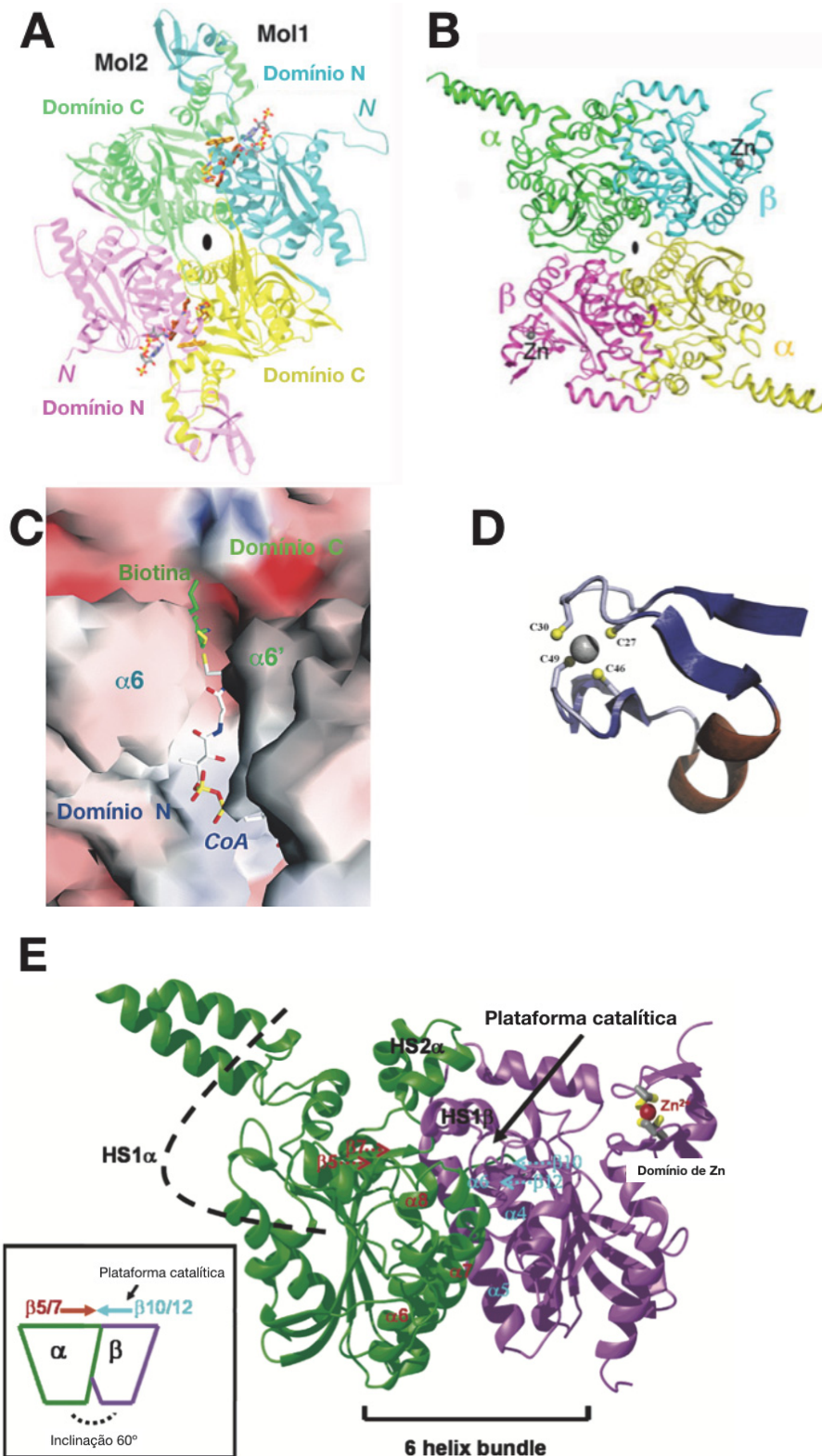


FIGURA 15 – Estrutura da carboxiltransferase (CT). **A:** Estrutura do dímero de CT de levedura. Monômero 1 está em lilás e amarelo. Monômero 2 em azul e verde claros. **B:** Estrutura da CT ($\alpha_2\beta_2$) de *S. aureus*. **C:** Região do *canyon* no sítio ativo da CT de levedura, com uma molécula de CoA reconhecida pelo domínio N e uma biotina em contato com o domínio C. **D:** Domínio de Zn da CT de *E. coli* mostrando os 4 resíduos de cisteínas estabilizando o metal. **E:** Estrutura da CT de *S. aureus*, monômeros α e β , em sua conformação “forte”. As linhas pontilhadas indicam a inclinação estrutural na transição de conformação “forte” para “fraca”. Coloração laranja e azul clara para as estruturas pertencentes às subunidades α e β , respectivamente. FONTE: Tong, 2013; Tong 2005; Bilder *et al.*, 2006; Meades *et al.*, 2010.

coli (Meades *et al.*, 2010) e plastidial em planta (Kozaki *et al.*, 2001). As cisteínas do motivo dede-Zn não estão diretamente envolvidas na ligação dos substratos, mas provavelmente desempenham importantes para o “controle de tráfego” dos substratos ao sítio ativo. Para o controle de catálise de CT, ocorre a formação de duas distintas interfaces entre monômeros α e β , uma denominada interface “fraca” e outra interface “forte” (Figura 15E). A interface “forte” é gerada pela inclinação do subdomínio HS1 α de 60° para fora e para a base da pirâmide triangular. Essa inclinação acarreta no agrupamento de 6 α -hélices e 4 folhas- β . O rearranjo estrutural das hélices α_6 , α_7 e α_8 do monômero α e α_4 , α_5 e α_6 do monômero β formam uma região chamada de *6 helix bundle*. A região *6 helix bundle*, encontrada também em outras estruturas crotonases (Hamed *et al.*, 2008), possui resíduos hidrofóbicos bem conservados (I181, L185 e L209 (α_7 -8 monômero α) e L174, M177 e A208 (α_6 -5 monômero β)) que provêm correta conformação para catálise. Por sua vez, o arranjo estrutural das cadeias β_5 e β_7 do monômero α e β_{10} e β_{12} do monômero β formam uma “plataforma catalítica”, que corresponde a região onde se tem os resíduos conservados importantes para a catálise em si, onde há a formação papel nas etapas catalíticas ou na liberação dos produtos (Meades *et al.*, 2010). Tais subdomínios são de malonil-CoA a partir de acetil-CoA na presença de carboxil-biotina-BCCP (Bilder *et al.*, 2006).

Numa região chamada de *canyon* na interface do dímero β e α (ou domínios N e C) se tem o sítio de ligação da base adenina do acetil-CoA, somente presente na subunidade α . Por sua vez, na subunidade β é onde ocorre a associação do grupo tiol da CoA. As hélices α_6 (subunidade β) e α'_6 (subunidade α) formam duas paredes do profundo *canyon*, no qual a menor cadeia- β do característico motivo $\beta\beta\alpha$ formam o “chão” dessa região. Espera-se que a biotina alcance o sítio ativo pela subunidade α , como ocorre na subunidade β da propionil-CoA carboxilase (PCC). A maioria dos resíduos envolvidos na formação das interfaces de interação entre subunidades ou subdomínios são altamente conservados (Bilder *et al.*, 2006; Tong, 2013).

Os resíduos responsáveis pela desprotonação do grupo amida do acetil-CoA são Gly199 e Gly200 da subunidade α (cadeia- β_5) e Gly207 e Gly208 da subunidade β (hélice- α_6), servindo como formadores de pontes de hidrogênio que constituem canais oxianions para estabilizar os ânions imidato na biotina e enolato no acetil-CoA, respectivamente (Bilder *et al.*, 2006; Silvers *et al.*, 2016).

2.3.1.4 Acetil-CoA carboxilase (ACC) de *S. cerevisiae*

A ACC eucariótica da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ScACC) teve sua estrutura completa, de toda sequência de aminoácidos, publicada recentemente na revista Nature em uma estrutura homodimérica de 500kDa, em que cada monômero multi-domínio de 250kDa possui um domínio BCCP, outro BC e outro CT. Na região N-terminal (resíduos 1-795) da sequência

monomérica situam-se os domínios BC, BCCP e mais uma região chamada BT, região de interação entre BC e BCCP. A região C-terminal (resíduos 1492-2233) contém os subdomínios N e C do domínio CT. A região central da ScACC (resíduos 796-1491) não possui função conhecida e sua sequência de aminoácidos é bastante variável entre ACCs eucarióticas (Wei & Tong, 2015).

A estrutura global da holoenzima ScACC possui forma de um quarto de disco com raio de $\sim 140\text{\AA}$ (Figura 16B) e espessura de $\sim 120\text{\AA}$ (Figura 16C). O domínio BC apresentou-se de forma dimérica, assim como a subunidade BC de *E. coli*, e está localizado próximo ao centro do disco da ScACC (Wei & Tong, 2015). A estrutura do domínio BC, quando isolado dos demais subdomínios da enzima ACC é monomérico e com uma conformação bastante distinta, o que pode explicar sua inativação quando não dimérica. (Chou *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2004; Janiyani *et al.*, 2001). O dímero do domínio CT forma a porção marginal do disco sua estrutura na holoenzima é essencialmente a mesma estrutura do domínio isolado (Zhang *et al.*, 2003), muito semelhante à CT de *E. coli* (Bilder *et al.*, 2006), exceto pela ausência do motivo dedo-de-zinco (Figura 16).

Na ScACC, o domínio BCCP está posicionado próximo ao centro de cada face da holoenzima e a biotina está localizada no sítio ativo de CT. Na região central da proteína há 5 domínios não catalíticos denominados domínios AC (ou CD) cuja função não é bem caracterizada e cuja contribuição para a formação do dímero ACC é mínima. A estrutura da ACC inteira sugere que a contribuição de AC parece ser o de favorecer a correta conformação dos dímeros de BC e CT para catálise. O domínio BT, situado na região N-terminal da ACC, ajuda a mediar interações entre BC e CT, na parte central das faces de cada protômero, uma vez que não há contato direto entre estes domínios e é formado por uma central e longa hélice envolvida por um barril anti-paralelo de oito cadeias (Figura 16) (Wei & Tong, 2015).

A inibição da ACC de mamíferos pode ocorrer pela fosforilação de um resíduo de serina antes do domínio BC (Ser80 ACC1 e Ser222 ACC2 em humanos) e também pela ligação de sorafeno A (Cho *et al.*, 2010) que reconhece um sítio de ligação do domínio BC isolado (na Trp487 do loop $\beta 19$ na ScACC), que não está disponível na BC dimérica, assim, inibindo de forma alostérica a estabilização da estrutura da BC para interagir com biotina-BCCP. Além disso, a diferença conformacional entre a estrutura da BC monomérica isolada e da BC dimérica na holoenzima é também crucial para a interação com o substrato, pois resíduos no *loop* $\beta 19$ - $\beta 20$ se movem em 10\AA , baseados no modelo de ligação da biotina em BC de *E. coli*, assim, tornando a conformação de BC imprópria para interagir com o substrato biotina-BCCP (Wei & Tong, 2015). Diferentemente da BC eucariótica, em *E. coli*, BC possui atividade catalítica independente das demais subunidades (Waldrop *et al.*, 1994) pela capacidade de formação de estrutura homodimérica, sendo capaz de hidrolisar ATP mesmo na ausência de biotina, mas, de forma bastante lenta. Por sua vez, a hidrólise de ATP por BC, quando complexada às outras subunidades da ACC (holo-BCCP e CT) e na presença de acetil-CoA,

sofre uma modificação conformacional que aumenta a hidrólise de ATP em 1100 vezes (Blanchard *et al.*, 1999).

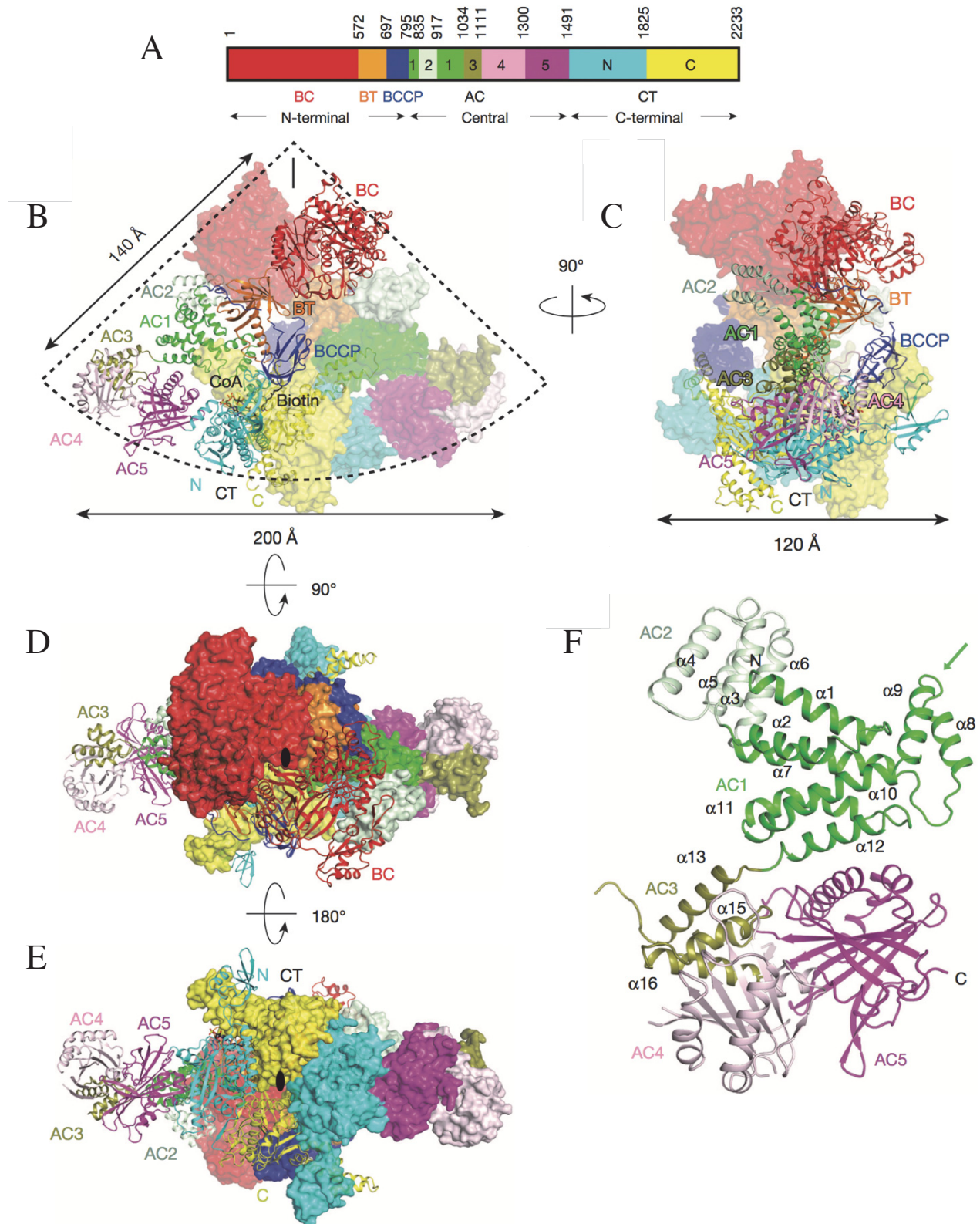


FIGURA 16 – Estrutura da ACC de *S. cerevisiae*. **A:** Organização dos domínios da ScACC, com indicação dos números de aminoácidos. **B:** Estrutura geral da ScACC representando um protômero como Ribbon e outro como superfície. **C:** Estrutura ScACC vista lateral. **D:** Inclinação da estrutura em B em 90° para baixo. **E:** Inclinação da estrutura em D em 180° para baixo. **F:** Estrutura da região central, de função não conhecida, indicando as 5 subdivisões (AC1-5) correspondentes às indicações em A.

Na análise estrutural da ScACC é sugerido que a biotina da BCCP é carboxilada no sítio ativo da BC do próprio protômero e então translocada para o sítio ativo do domínio C da CT do outro protômero formador do dímero de ScACC (Wei & Tong, 2015).

2.4 REGULAÇÃO DA ACETIL-CoA CARBOXILASE (ACC)

A ACC é a enzima engajada na primeira e irreversível etapa da síntese de ácidos graxos na maioria dos domínios, exceto *Archaea* e algumas micobactérias (Cronan & Waldrop, 2002). Em *E. coli* e em muitas bactérias, as subunidades da enzima ACC são codificadas por 4 genes *acc*, sendo todos essenciais para o crescimento (Baba *et al.*, 2006; Cronan & Waldrop, 2002). Os genes *accB* e *accC* codificam para as proteínas BCCP e BC, respectivamente, e localizam-se juntos em um operon *accBC* a 73.35 min no cromossomo (3403.1 kb) de *E. coli* MG1655 (selvagem), com *accB* situando-se na extremidade 5' do operon (a montante). Por sua vez, os genes que expressam as subunidades α e β da proteína CT são *accA* e *accD*, respectivamente, os quais encontram-se bastante separados no cromossomo bacteriano (4,50 e 53,40 min respectivamente) (Li & Cronan, 1993). Em algumas bactérias Gram-positivas os genes *accB* e *accC*, assim como *accA* e *accD*, encontram-se agrupados, juntos com demais genes da síntese de ácidos graxos (Cronan & Waldrop, 2002). Distribuição incomum dos genes *acc* é encontrada no genoma de *Mycobacterium tuberculosis*, onde há três genes anotados como codificantes para as subunidades BC/BCCP (*accA1-3*) e seis para CT (*accD1-6*), sendo que normalmente os organismos apresentam apenas 1 ou 2 ACCs (Reddy *et al* 2014). Análise proteômica de *E. coli* e uma bactéria proximamente relacionada *Shigella flexneri*, indicam quantidades equimolares de BC, CT α e CT β , com BCCP ocorrendo a nível duas vezes maior que BC (Ishihama *et al.*, 2008; Kuntumalla *et al.*, 2009).

A expressão dos genes *acc* deve ocorrer de forma coordenada para expressão equimolar das subunidades, para que haja formação de ACC funcional (Li & Cronan, 1992). O controle transcricional do operon *accBC* ocorre pela auto-regulação exercida por BCCP em *E. coli* e essa co-regulação é conservada em outras bactérias (Marini *et al.*, 2001). A super-expressão de BCCP gera uma diminuição do conteúdo de RNAm *accBC* (James & Cronan, 2004) (Figura 17B). A substituição do promotor do operon *accBC* nativo, na posição cromossomal original, por um promotor *lac* causa a não-repressão do transcrito *accBC* quando BCCP é superexpressa. Além disso, na super-expressão somente da porção C-terminal de BCCP não ocorre repressão do transcrito *accBC*. Esses dados sugerem que a porção N-terminal de BCCP liga-se diretamente na região promotora. No entanto, na sequência de aminoácidos de BCCP não há indício de um sítio de ligação ao DNA conhecido e experimentos de *gel-shift* falharam ao tentar corroborar tal hipótese. Alternativamente, parece mais

plausível propor que BCCP interaja com outra proteína que desempenhe ou desencadeie por meio de outra proteína (ou RNA) a função de ligação direta no promotor do operon *accBC*, reprimindo, assim, sua transcrição (James & Cronan, 2004).

A expressão coordenada do operon *accBC* se mostra importante também pela eficiência de biotinylation de BCCP, que pode ser afetada pela super-expressão de BC. Quando BC está em excesso, ela liga-se a BCCP, no entanto, BCCP é mais eficientemente biotinilada quando na sua forma não

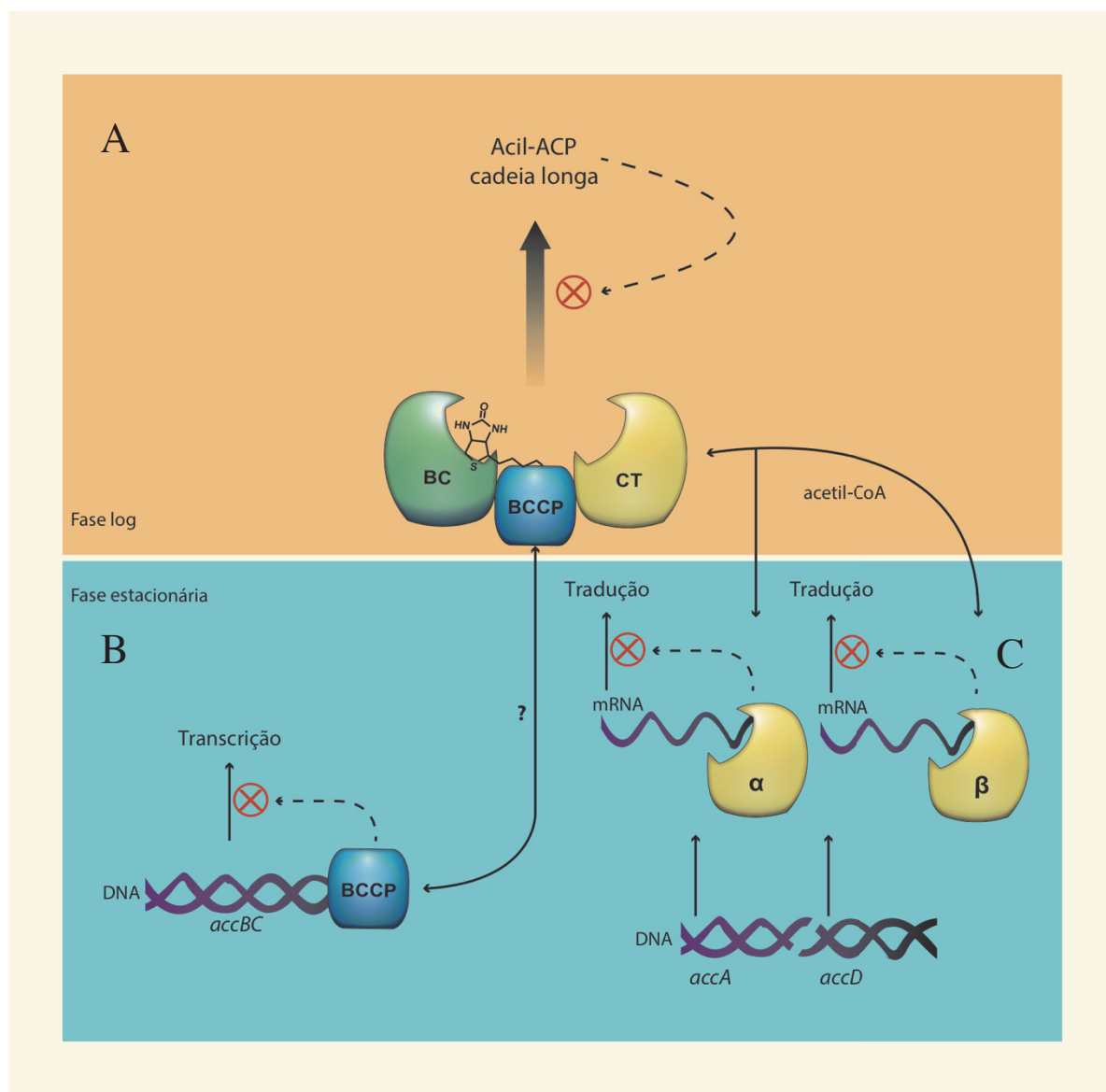


FIGURA 17 – **Regulação da ACC de *E. coli*.** **A:** Em fase log, com o aumento da concentração do produto final da síntese de ácidos graxos, acil-ACPs, estes ligam-se à ACC de forma direta, inibindo sua atividade (Davis & Cronan, 2001; Evans *et al.*, 2017). **B:** Por sua vez, a BCCP é capaz de controlar a transcrição do operon *accBC*, não se sabe se de forma direta ou indireta (James & Cronan, 2004). **C:** Em fase estacionária, as subunidades α e β de CT ligam-se aos seus respectivos RNAs inibindo a própria tradução. Quando em fase log, a maior abundância de acetil-CoA leva a ligação desta molécula no seu sítio ativo em CT, desfavorecendo a interação CT-RNA (Meades *et al.*, 2010). FONTE: o autor, baseado nos artigos citados.

complexada com BC, assim, a biotina acaba se acumulando no citoplasma por estar sendo adicionada à BCCP em uma menor taxa, consequentemente, a proteína BirA reprime o operon *bioABCDF*, que expressa genes para a síntese de biotina (Cronan, 2015; Abdel-Hamid e Cronan, 2007). Além disso, o efeito de redução da síntese de ácidos graxos pela super-expressão de BC ou de BCCP é revertida quando ambas as proteínas são super-expressas em quantidades equimolares (Karow *et al.*, 1992).

A proteína CT de *E. coli* também é descrita como sendo auto-regulada, mas a nível traducional e é expressa em quantidade equimolar, sob a mesma taxa de expressão (Li *et al.*, 2014) (Figura 17C). CT possui o motivo dedo-de-Zn que é capaz de se ligar ao DNA, no entanto, a ligação ao DNA ocorre de forma inespecífica, o que indica que ligação ao DNA não configura função fisiológica de CT. Contudo, há uma proteína com domínio dedo-de-Zn homóloga a CT, a 50S ribossomal, que se liga a RNA. Assim, Meades *et al.* (2010), testaram a capacidade de interação de CT com RNA e foi verificado que CT liga-se à RNA preferencialmente. Os RNAm codificantes para subunidades α e β de CT apresentaram maior capacidade de inibição de complexo CT-DNA do que CT-RNAm totais de *E. coli* e CT-RNAt de *S. cerevisiae*. Além disso, uma série de RNAm codificantes para as subunidades de CT (α e β) de diferentes tamanhos foram testados e, assim, verificou-se que dentro da sequência dos RNAm das subunidades α e β há uma pequena sequência com 41% de homologia entre elas que, quando ausente nos segmentos de RNAm testados, não interagiram com CT. Em ensaio que mensura a transcrição/tradução *in vitro*, foi verificado que conforme aumento da concentração de CT ocorre aumento da inibição da tradução e que essa inibição é revertida na presença de acetil-CoA de forma dose-dependente.

Assim, Meades *et al.* (2010) propuseram uma hipótese para como se dá a coordenação da tradução dos genes *accA* e *accD*. Durante a fase estacionária, quando a síntese *de novo* de ácidos graxos é desnecessária, o nível de glucose é baixo e assim o nível de acetil-CoA também é baixo. O baixo nível de acetil-CoA permite que a CT se ligue ao seu próprio RNAm codificante das subunidades α e β , ligação esta mediada pelo motivo dedo-de-Zn, assim inibindo a tradução própria. Por sua vez, durante a fase log, a biogênese da membrana se faz necessária e nesse momento celular a glicose é abundante, logo, acetil-CoA torna-se abundante e liga-se em CT desligando-a do RNAm próprio e, assim, permitindo a tradução do RNAm. Deste modo, a ACC pode atuar na síntese de ácidos graxos em uma rápida resposta ao estado metabólico celular (Meades *et al.*, 2010).

No entanto, há um artigo de Smith e Cronan (2014), que é dedicado a refutação da hipótese de repressão traducional da CT pela ligação de CT ao RNAm próprio, proposto por Meades *et al.*, (2010). Smith e Cronan (2014) relataram experimentos *in vivo* que não corroboram a hipótese proposta por Meades *et al.*, (2010), e argumentam que o tamanho dos RNAm testados (500-600 nucleotídeos), por serem muito grandes, não existem *in vivo* pois, em bactéria, tradução e transcrição são eventos acoplados (Gowrishankar & Harinarayanan, 2004; Squires & Zaporozhets, 2000). Em *E.*

coli, há um eficiente sistema que aborta o alongamento de RNAm não traduzido, realizado pelo fator de terminação Rho, que se liga no RNAm nascente ou que não esteja protegido por ribossomo, requerindo apenas 80 nucleotídeos para ligação, translocando-se (5'-3') e liberando a RNA polimerase (Koslover *et al.*, 2012), esta característica da proteína Rho impossibilitaria o mecanismo proposto por Meades *et al.*, (2010). Por isso, os RNAm testados por Meades *et al.* (2010), provavelmente não existem *in vivo*. Além disso, os RNAm codificantes das subunidades α e β de CT possuem afinidade 4-vezes maior que os RNA totais. Isso seria uma especificidade muito baixa considerando que os RNA totais ocorrem em muito maior quantidade na célula, portanto, tal afinidade seria inespecífica e, assim, não se faz suficiente para caracterizar uma ação regulatória. Smith e Cronan também questionam a ausência de testes com moléculas semelhantes ao acetil-CoA para validar a especificidade do desligamento do complexo CT-RNAm, como CoA sozinho, malonil-CoA ou succinil-CoA (Smith & Cronan, 2014).

Outro mecanismo regulatório da acetil-CoA carboxilase ocorre pela direta interação de derivados acilados da proteína ACP (*Fatty-acyl carrier protein*) (acil-ACP) (Figura 17A). Acil-ACPs de comprimento entre 6 e 20 carbonos inibem a ACC, e múltiplas enzimas da síntese de ácidos graxos, de forma dose dependente, caracterizando inibição por *feedback* negativo, uma vez que acil-ACP é produto da via biossintética de ácidos graxos. O acúmulo de acil-ACP configura, assim, um modo de controle não só da produção de ácidos graxos, mas também da taxa de crescimento. Essa inibição por acil-ACP acarreta em até 60-70% da redução da atividade da ACC na presença de concentração fisiológica dos acil-ACPs testados (Davis & Cronan, 2001; Heath & Rock, 1996; Evans *et al.*, 2017). Por sua vez, uma estratégia de engenharia metabólica empregada para diminuir os níveis de acil-ACP e, assim, super-produzir ácidos graxos livres (FFA), se dá pela super-expressão de tioesterases, que convertem acil-ACP de cadeia longa (>12C) em ácidos graxos livres, os quais são então excretados da célula quando produzidos em excesso, como quando sob super-expressão de tioesterases (Jiang & Cronan, 1994; Cho & Cronan, 1995; Voelker & Davies, 1994; Ohlrogge *et al.* 1995). Uma vez que, a super-expressão de ACC sozinha não resulta em aumento da produção de ácidos graxos (Davis & Cronan, 2001; Lennen *et al.*, 2010), somente quando ACC é co-super-expressa com a tioesterase (TesA) de *E. coli*, é concebível entender que a etapa limitante é a formação de malonil-CoA pela ACC (Davis *et al.*, 2000).

Por sua vez, em plantas, os genes codificantes das subunidades da ACC heteromérica de *A. thaliana* estão localizados no genoma nuclear, exceto *accD*, localizado no cromossomo plastidial. Cada subunidade possui um único gene codificante, exceto BCCP que possui dois genes, que expressam as isoformas BCCP1 e BCCP2 (Salie & Thelen, 2016). A BCCP2 é expressa em muito menor nível que BCCP1 e não possui fenótipo mutante letal, diferentemente do mutante BCCP1, que apresenta resposta fenotípica letal (Li *et al.*, 2011). Ambas as subunidades BCCP (1 e 2) da ACC de

A. thaliana formam complexo com proteínas PII dependentemente de MgATP. Tal interação reduz a V_{\max} de ACC sem afetar o K_m por acetil-CoA. O 2-oxoglutarato, piruvato ou oxaloacetato reverterem a inibição de ACC por PII (Feria Bourrellier *et. el.*, 2010). Em *A. thaliana* foi observado que a mutação do gene PII causa acúmulo de ácidos graxos nas sementes (Baud *et al.*, 2010).

Em mamíferos, a ACC possui sua atividade regulada a diversos níveis. A forma rápida, ou local de regulação da ACC ocorre por meio de reguladores alostéricos, como citrato, CoA, palmitoil-CoA e por reversível fosforilação. De outro lado, a ACC é também regulada de forma lenta e sistêmica, pela dieta, hormônios e pela atividade de fatores de transcrição globais. Além disso, a existência de isoenzimas de ACC1 e ACC2 também proporcionam adicional maleabilidade na regulação da ACC de forma tecido-específica em resposta a diferentes condições e necessidades celulares (Tong, 2013; Tong, 2005; Wakil & Abu-Elheiga, 2009).

Em relação a regulação de ACC de mamíferos por citrato, estudos sugerem que há dois sítios de ligação ao citrato, um sítio de ativação de alta afinidade ($K_d \sim 1$ mM) e um sítio de inibição de baixa afinidade ($K_i \sim 30$ mM). O citrato aumenta o K_{cat} (3 vezes) e K_{cat}/K_m (10 vezes) do ATP e acetil-CoA para a ACC2, com um K_a de ~ 0.5 mM (Kaushik *et al.*, 2009). No entanto, um estudo comparativo mostrou que a ACC2 tem sua atividade aumentada 1000 vezes pelo citrato enquanto que a ACC1 é ativada somente 4 vezes (Locke *et al.*, 2008). Por sua vez, sobre a regulação da ACC por fosforilação, a proteína quinase AMP-ativada (AMPK) é a enzima que ataca o resíduo Ser80 de ACC1 e Ser222 de ACC2 para fosforilação, já a proteína quinase cAMP-dependente (proteína quinase A) é a enzima que catalisa a fosforilação do resíduo Ser201 da ACC1 (Tong, 2013) em mamíferos. Assim, a ACC1 humana, quando fosforilada, interage com BRCA1 tendo sua atividade reduzida (Ray *et al.*, 2006; Ray *et al.*, 2009).

Em humanos, o gene da ACC1 está localizado no cromossomo 17q12 e a ACC2 no cromossomo 12q13. Há múltiplos promotores regulando esses genes e são necessários no comando de *splicing* alternativo na ponta 5' do RNAm de ACC1 (Mao *et al.*, 2003) e na modificação da porção N-terminal (Barber *et al.*, 2005). A ACC1 possui 3 principais promotores, os promotores PI, PII e PIII, os quais são ativados pelos hormônios triiodotironina e reprimidos por colesterol (Mao *et al.*, 2003). A ACC2 possui 2 promotores, o promotor I regula a expressão tecido específica de ACC e o promotor II tem a regulação mediada por fatores miogênicos, como o MyoD e o fator músculo regulatório 4 (MRF4) (Kim, Lee e Kim, 2003). A expressão dos genes das ACCs humanas é controlada por diversos fatores de transcrição, como SBERP1, SREBP1c e ChREBP (Tong, 2005). Uma dieta livre de lipídeos torna as ACCs mais ativas e a privação de alimento ou diabetes tornam as ACCs menos ativas. Dieta rica em carboidratos induz a transcrição da ácido graxo sintetase (FAS), ACC1 e ACC2. A dieta está relacionada a ação de fatores de transcrição que atuam em resposta aos hormônios insulina e glucagon. Em estado suprido de alimentação, a glucose excessiva é convertida

em ácidos graxos na forma de triglicerídeos. Assim, com o aumento da insulina no estado alimentado se dá a desfosforilação de ACC, aumentando sua atividade, enquanto que glucagon e epinefrina tem efeito oposto (Kim, 1997; Wakil e Abu-Elheiga, 2009; Pégrier *et al.*, 2004).

A atividade de ACC também é regulada pelo controle da polimerização, em que uma proteína citosólica, a MIG12 (~20kDa), promove a polimerização da ACC1 pelo estímulo de citrato e é incorporado dentro do polímero (Kim *et al.*, 2010). A afinidade da MIG12 é negativamente regulada pela formação de complexo com uma outra proteína, a Spot 14 (~17kDa) (Colbert *et al.*, 2010)

2.5 METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS EM BACTÉRIAS

O metabolismo de ácidos graxos é uma das vias metabólicas mais amplamente encontradas nos seres vivos. Em eucariotos e procariotos, os ácidos graxos são precursores de lipídeos estruturais tais como fosfolipídeos e esfingolipídeos. No metabolismo de ácidos graxos em bactérias, o metabolismo de ácidos graxos tipo II, cada etapa é catalisada por uma enzima (Figura 18). Diferentemente da síntese de ácidos graxos em eucariotos, metabolismo de ácidos graxos tipo I, em que as etapas são catalisadas por um complexo multi-enzimático, a ácido graxo sintase (Cronan & Waldrop, 2002). Em Bacteria, ácidos graxos direcionados à síntese da membrana celular provém de fonte biossintética (FAB) e/ou exógena (Beld *et al.*, 2016).

A primeira etapa da síntese de ácidos graxos é catalisada pela enzima acetil-CoA carboxilase (ACC), pela carboxilação do acetil-CoA à malonil-CoA. Consecutivamente, o malonil-CoA tem a porção malonil transferida para a proteína ACP (*Fatty-acyl carrier protein*) produzindo malonil-ACP, reação catalisada pela enzima malonil-CoA:ACP transacilase (FabD), o que direciona a neogênese de ácidos graxos de cadeia longa (>12C). As enzimas 3-cetoacil-ACP sintase I, II e III (FabB, FabF e FabH, respectivamente) catalisam a formação do 3-cetoacil-ACP pela condensação de acil-ACPs com malonil-ACP. No primeiro ciclo do alongamento de ácidos graxos ocorre a condensação do malonil-ACP com acetil-CoA (primeiro fornecedor de grupo acila) formando 3-cetoacil-ACP pela ação catalítica da FabH. Subsequentes etapas de alongamento são performadas pelas enzimas FabF ou FabB, a partir do acil-ACP gerado ao final da primeira etapa e assim por diante, após as consecutivas rodadas de alongamento. A seguinte reação de condensação do 3-cetoacil-ACP gerado pelas enzimas FabH e FabF ou FabB é catalisada pela enzima 3-cetoacil-ACP redutase (FabG), formando de forma reversível 3-hidroxiacil-ACP, a custo de um NADH e H⁺. Na próxima reação as enzimas FabZ (3-hidroxiacyl-ACP desidratase) e FabA (3-hidroxi-decanoil-ACP desidratase) catalisam a desidratação do 3-hidroxiacil-ACP originando *trans*-2-enoil-ACP, este, por conseguinte, pode ainda ser isomerizado pela FabA a *cis*-2-enoil-ACP na primeira reação direcionada a síntese de

ácidos graxos insaturados. Por fim, na última etapa do ciclo da síntese de ácidos graxos saturados, o 2-enoil-ACP produzido pelas enzimas FabZ e FabA é reversivelmente reduzido a acil-ACP (alongado em 2 carbonos) pela enoil-ACP redutase (FabI) ao custo de um $\text{NADH} + \text{H}^+$ ou $\text{NADPH} + \text{H}^+$. O acil-ACP gerado pode então reiniciar o ciclo de alongamento pela atividade das enzimas FabB e FabF (Yao & Rock, 2017; Janßen & Steinbüchel, 2014; Lennen & Pfeleger, 2012; Parson & Rock, 2013).

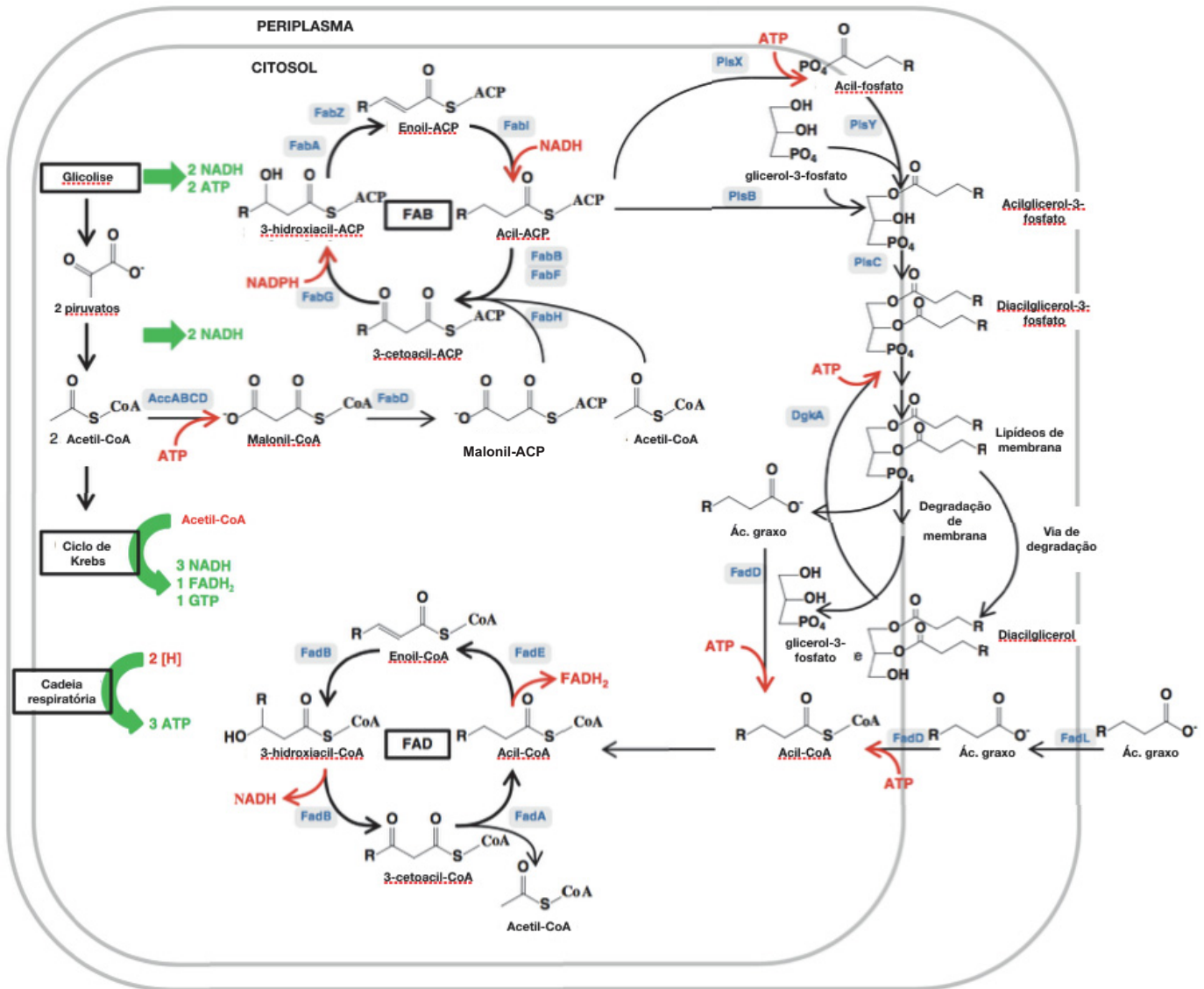


FIGURA 18 – Biossíntese e degradação de lipídeos em *E. coli*. FAB: Biossíntese de ácidos graxos. FAD: Degradação de ácidos graxos. ATP e equivalentes redutores estão indicados em vermelho se consumidos e verde se gerados, exceto em FAD. Enzimas estão indicadas em azul. FONTE: Janßen e Steinbüchel, 2014.

Escherichia coli produz ácidos graxos saturados e insaturados para a bicamada lipídica. A taxa de saturação e insaturação é controlada principalmente com ajuda das enzimas FabA e FabB

(Campbell & Cronan 2001; Wang & Cronan 2004). A síntese de ácidos graxos também é regulada a nível transcricional (Brown & Gulig 2008) e traducional (Polyak *et al.* 2011).

Em bactérias, o produto final da biossíntese de ácidos graxos, acil-ACP, tem como principal finalidade a manutenção e a constituição da membrana celular (Li e Cronan, 1993). Os acil-ACPs produzidos podem ser ativados por fosforilação pela PlsX, assim, às moléculas de acil-fosfato resultantes são adicionadas ao glicerol-3-fosfato pela PlsY, gerando acilglicerol-3-fosfato, que pode também, alternativamente, ser gerado pela direta condensação do acil-ACP com glicerol-3-fosfato pela PlsB. A enzima PlsC se encarrega da próxima etapa para formação de diacilglicerol-3-fosfato e, assim, propiciar formação dos lipídeos de membrana (Janßen e Steinbüchel, 2014).

A degradação de ácidos graxos é basicamente a reação inversa à biossíntese. Na via de degradação de ácidos graxos, se ácidos graxos forem a fonte exógena de carbono, o transportador FadL se liga a estes lipídeos, modificando sua conformação de forma que se abre o poro de FadL permitindo a internalização lipídica. O transporte dos ácidos graxos absorvidos do periplasma para o citosol é mediado pela FadD, que catalisa também a ativação ATP-dependente do ácido graxo pela formação de acil-CoA ester. Ácidos graxos clivados da membrana também são consumidos na via da β -oxidação. A FadE é a enzima engajada na redução do acil-CoA formado a enoil-CoA, gerando um FADH₂. A FadB catalisa a hidratação do enoil-CoA a 3-hidroxiacil-CoA e depois oxida este intermediário a 3-cetoacil-CoA. A última etapa se dá pela atividade da enzima FadA que resulta na geração de um acetil-CoA e um acil-CoA diminuído em 2C. A última clivagem final do acetoacetil-CoA é performada pela YquF (Yao & Rock, 2017; Janßen & Steinbüchel, 2014; Lennen & Pfeleger, 2012).

Em *E. coli*, vários genes da biossíntese de ácidos graxos ou sua degradação são controlados a nível transcricional. Os principais fatores de transcrição envolvidos são as proteínas FadR, FabR e a molécula (p)ppGpp. FadR reprime todos os genes que codificam para as proteínas da β -oxidação. Tal repressão ocorre pela ligação de FadR nos sítios promotores. A liberação desses sítios acontece pela interação de FadR com acil-CoA de cadeia longa, que se acumula em caso de absorção de fonte externa ou degradação da membrana. Na presença de glucose, a transcrição dos genes *fad* ocorre somente em nível muito baixo, mesmo se houver ácidos graxos disponíveis. Além disso, FadR também realiza a ativação da transcrição dos genes *fabA* e *fabB* e o operon *fabHDG*, sendo assim, também controla a formação de ácidos graxos saturados e insaturados. A proteína FabB também exerce controle transcricional sobre a síntese de ácidos graxos reprimindo os genes *fabA* e *fabB*, embora *fabA* seja mais fortemente influenciado pela ação de FadR (Janßen & Steinbüchel, 2014).

Sob ótimas condições de crescimento, a concentração de (p)ppGpp é muito baixa. No entanto, o nível de (p)ppGpp pode aumentar sob condições limitantes de aminoácidos, carbono, fosfato, ferro ou pela inibição da via biossintética de ácidos graxos. Nível elevado de (p)ppGpp tem direto e indireto

impacto na biossíntese de ácidos graxos, pela inibição da PlsB, de FabZ e ativação de RpoS que induz a expressão dos genes *fad*, em resposta à sinais de estresse celular via cAMP (Janßen e Steinbüchel, 2014; Battesti *et al.*, 2011).

A produção bacteriana de ácidos graxos pode ser modificada por meio da engenharia genética para se aumentar a produção desses compostos e possibilitar aplicações biotecnológicas. A partir dos ácidos graxos super-produzidos em estirpes modificadas de *E. coli* já se tem consideráveis avanços na geração de biocombustíveis. A produção bacteriana de biocombustíveis visa diminuir a forte dependência que existe da utilização de combustíveis fósseis. Os biocombustíveis atuais (álcoois e diesel) necessitam de dispendioso processamento e não possuem total compatibilidade com os motores de combustão que predominam no mercado (National Renewable Energy Laboratory 2009; Yüksel & Yüksel, 2004; Handke, Lynch & Gill, 2011). A produção de biocombustível idêntico estrutural e quimicamente a hidrocarbonetos de origem petrolífera em *E. coli* é bastante promissora. Já se pode atualmente super-produzir ácidos graxos livres em *E. coli* e também dirigir a célula a super-produzir alcanos por meio da engenharia genética (Howard *et al.*, 2013). A super-expressão de ACC em *E. coli* aumentou a quantidade de malonil-CoA e a produção de ácidos graxos livres quando sob co-super-expressão de uma tioesterase (Davis & Cronan *et al.*, 2001). Além disso, a estreita regulação da taxa de expressão das subunidades BC:BCCP da ACC bacteriana parece ser crucial para o crescimento de *E. coli* e produção de ácidos graxos (Abdel-Hamid & Cronan, 2007). Por isso, a interação entre PII e a subunidade BCCP da ACC demonstrada em planta (Feria Bourrellier *et al.*, 2010) e em bactéria (Rodrigues *et al.*, 2014) pode desvendar um importante processo regulatório a ser explorado com o intuito de se otimizar a produção de ácidos graxos, logo, a produção de biocombustíveis.

Além da abordagem biotecnológica que se pode tomar para justificar a importância do estudo da interação entre as proteínas PII e ACC, é de grande valia ressaltar a implicação que o melhor conhecimento da regulação da enzima ACC pode conferir a medicina e a saúde pública. Pois, uma vez que ACC possui um papel crucial no metabolismo de quase todos os organismos encontrados na natureza, esta enzima é um forte atrativo para o descobrimento de drogas que atuem contra doenças humanas, infecções bacterianas, infecções por fungos, diabetes, câncer, arteriosclerose, síndromes metabólicas (as quais estão ligadas à obesidade) e outras (Cronan & Waldrop, 2002; Tong, 2005; Campbell & Cronan, 2001; Walkil & Abu-Elheiga, 2009; Reaven, 2011).

Potentes inibidores da subunidade BC da ACC multi-subunidade bacteriana tem sido desenvolvidos, com potencial para uso como antibióticos. Estes compostos se ligam seletivamente ao sítio de interação de ATP da BC (Mochalkin *et al.*, 2008; Polyak, 2009). Para a atividade da subunidade CT da ACC bacteriana os produtos naturais Moiramida B, não utilizável clinicamente (Bilder *et al.*, 2006) e andrimida são inibidores conhecidos. Um sítio único de mutação (M203L) na

subunidade β da CT de *E. coli* produz resistência à andrimida (Liu *et al.*, 2008). Compostos de óleo de cinamomo são inibidores da atividade da CT, o que explica parcialmente o efeito antibacteriano da casca de cinamomo (Meades *et al.*, 2010). Contudo, não há relatos de inibidores da subunidade BCCP, embora seja também um importante alvo de estudo para uma abordagem clínica.

A importância do desenvolvimento de novos antibióticos se dá pela crescente aquisição de multi-resistência por bactérias infecciosas em ambientes hospitalares. Bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* e Gram-negativas como *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* facilmente adquirem resistência aos clássicos antibióticos utilizados em clínicas (Munita e Arias, 2016). Por isso, para o desenvolvimento de novas drogas é importante se conhecer mecanismos de inibição de seus possíveis alvos, proteínas-chave, como a ACC.

Além do apelo biotecnológico e médico, o estudo da inibição da ACC pelas proteínas PII também pode ser de importante contribuição para desenvolvimento de herbicidas. A enzima ACC multi-domínios eucariótica de plastídeo de grama é alvo de três classes de herbicidas comerciais, ariloxifenoxipropionatos (APPs ou FOPs), ciclohexanedionas (CHDs ou DIMs) e pinoxadeno (Gronwald, 1991; Hofer *et al.*, 2006; Muehlebach *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2010). Os inibidores FOP e DIM têm sido usados no campo por mais de 30 anos e mutações de resistência contra eles têm sido relatadas (Devine & Shukla, 2000; Yu *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007; Délye *et al.*, 2008; Cruz-Hipolito *et al.*, 2011). Pinoxadeno foi introduzido em 2006, mas gramas resistentes já foram descobertas, provavelmente devido a resistência cruzada de FOPs e/ou DIMs (Petit *et al.*, 2010; Scarabel *et al.*, 2011). Foram também identificadas aquisição de resistências a pinoxadeno em outras plantas (Gronwald, 1991; Hofer *et al.*, 2006; Muehlebach *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2010).

Além do mais, e não menos importante, a contribuição científica do estudo proposto no presente trabalho propicia um degrau a mais no entendimento da regulação do metabolismo de carbono e nitrogênio e na bioquímica das proteínas PII e da ACC, atuantes em vias metabólicas clássicas, porém, não totalmente conhecidas.

3 OBJETIVOS

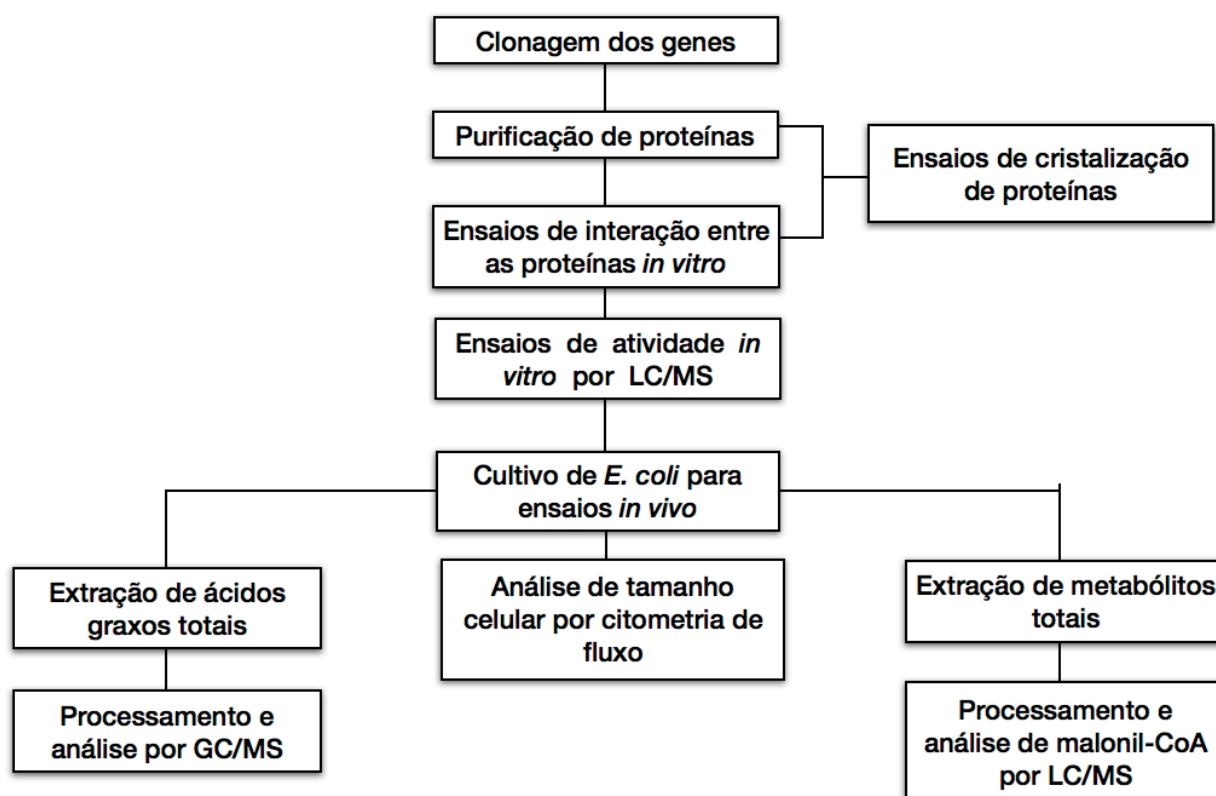
3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar *in vitro* a interação entre as proteínas PII e BCCP de *Escherichia coli*, assim como, demonstrar fenótipo resultante dessa interação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonar genes e purificar as proteínas GlnB, BCCP, BC e CT de *E. coli* em suas formas nativa e com cauda de 6xHis.
- Realizar ensaios de interação entre PII e BCCP, assim como, testar demais componentes ACC de *E. coli*.
- Identificar a efeito da interação PII-ACC na atividade da ACC *in vitro* por mensuramento de malonil-CoA em LC/MS.
- Realizar ensaios de cristalização do complexo PII-BCCP e da GlnD de *E. coli*.
- Determinar o efeito fisiológico da interação PII-BCCP através da mensuração dos níveis de malonil-CoA e de ácidos graxos *in vivo*.

3.3 FLUXOGRAMA METODOLÓGICO:



4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CÉLULAS, PLASMÍDEOS E MEIOS DE CULTIVO

As células e plasmídeos usados neste trabalho estão relacionados na tabela 1. Os meios de cultivo utilizados foram os meios ricos LB (líquido), LA (sólido), conforme Sambrook *et al.*, 1989, e meio mínimo M9 suplementado com NH_4Cl 30mM (Na_2HPO_4 45mM, KH_2PO_4 17mM, NaCl 6,8mM, glucose 0,4%, CaCl_2 0,1mM, MgSO_4 2mM). O meio nos quais as células foram crescidas são especificados conforme o experimento.

Os antibióticos utilizados foram adicionados aos cultivos celulares para concentração final de 250µg/mL de ampicilina (Amp), 10µg/mL de ác. nalidíxico (Nal), 80µg/mL de streptamicina (Sm), 50µg/mL de canamicina (Km) e 30µg/mL de cloranfenicol (Cm).

Tabela 1- Células e plasmídeos:

Estirpe/Plasmídeo	Genótipo/Fenótipo	Fonte/Referência
<i>E. coli</i>		
DH10B	Sm ^r ; F'[proAB ⁺ lacM15]	Invitrogen
BL21 (DE3)	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ , m _B ⁻) gal dcm (DE3)	Agilent
BL21 star TM (DE3)	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ , m _B ⁻) gal dcmrne131 (DE3)	Thermo Fisher
ET8000	Rbs lacZ::IS1 gyrA hutC _K . Nal ^r	Macneil, 1981
PT8000	rbs lacZ::IS gyrA hutC _K ΔglnB1. Nal ^r	Reyes-Ramirez <i>et al.</i> , 2001
FT8000	rbs lacZ::IS gyrA hutC _K ΔglnB1, ΔglnK1. Nal ^r	Reyes-Ramirez <i>et al.</i> , 2001
plasmídeos		
pET28a	Km ^r . Vetor de expressão promotor T7	Novagen
pET29a	Km ^r . Vetor de expressão promotor T7	Novagen
pMSA4	Km ^r . (pET28a). Expressa GlnZ de <i>A. brasilense</i>	Moure <i>et al.</i> , 2012
pLH25PET	Km ^r . (pET28a). Expressa GlnB de <i>A. brasilense</i> .	Huergo <i>et al.</i> , 2005
pLHDK5PII	Amp ^r . (pDK5). Expressa GlnB de <i>A. brasilense</i> . Promotor <i>ptac</i> .	Huergo <i>et al.</i> , 2005.
pET16baccAD	Amp ^r . (pET16b). Expressa CT de <i>E. coli</i> . 6x His N-terminal na CTα.	Soriano <i>et al.</i> , 2006
pET16baccC	Amp ^r . (pET16b). Expressa BC de <i>E. coli</i> . 6x His N-terminal.	Soriano <i>et al.</i> , 2006
pCY216	Cm ^r . Expressa BirA de <i>E. coli</i> . Promotor <i>araBAD</i>	Chapman-Smith <i>et al.</i> , 1994
pJT25	Amp ^r . (pT7-7). Expressa GlnK de <i>E. coli</i>	Radchenko <i>et al.</i> , 2010
pTRPETHisGlnK	Km ^r . (pET28a) Expressa GlnK de <i>E. coli</i> . 6x His N-terminal	Rodrigues <i>et al.</i> , 2014
pTRPETBCCPn	Km ^r . (pET29a) Expressa BCCP de <i>E. coli</i> .	Rodrigues <i>et al.</i> , 2014
pTRPETGlnB	Km ^r . (pET29a) Expressa GlnB de <i>E. coli</i> .	Este trabalho
pTRPETHisGlnB	Km ^r . (pET28a) Expressa GlnB de <i>E. coli</i> . 6x His N-terminal	Este trabalho
pTRPETBC	Km ^r . (pET29a) Expressa BC de <i>E. coli</i> .	Este trabalho
pTRPETHisBCCP	Km ^r . (pET28a) Expressa BCCP de <i>E. coli</i> . 6x His N-terminal	Este trabalho
pTRPETAccA	Km ^r . (pET29a) Expressa CTα de <i>E. coli</i> .	Este trabalho
pTRPETAccD	Km ^r . (pET29a) Expressa CTβ de <i>E. coli</i> .	Este trabalho
pJexpress411-AccD	Km ^r . (pJexpress411) Expressa CTα de <i>E. coli</i> . 6x His N-terminal.	Xiao <i>et al.</i> , 2013
pXY30	Km ^r . (pET28a) Expressa CTβ de <i>E. coli</i> . 6x His N-terminal.	Xiao <i>et al.</i> , 2013
pMAMLV1	Km ^r . (pET28a) Expressa GlnB de <i>A. brasilense</i> . 6x His N-terminal.	Araújo <i>et al.</i> , 2004
pMSA3	Km ^r . (pET28a) Expressa GlnZ de <i>A. brasilense</i> . 6x His N-terminal.	Araújo <i>et al.</i> , 2004
pMSA4 Q42HS52VS54D	Km ^r . (pET28a) Expressa GlnZ triplo mutante (Q42H, S52V, S54D) de <i>A. brasilense</i> .	Moure <i>et al.</i> , 2013
pMSA4 S52VS54D	Km ^r . (pET28a) Expressa GlnB duplo mutante (Q42H, S52V, S54D) de <i>A. brasilense</i> .	Moure <i>et al.</i> , 2013
pGlnB Δ42-54	Km ^r . (pET28a) Expressa GlnB, c/ deleção do loop-T, de <i>A. brasilense</i> .	Moure <i>et al.</i> , 2013
pGlnBZ	Km ^r . (pET28a) Expressa GlnBZ (1-92 de GlnB e 93-102 de GlnZ de <i>A. brasilense</i>).	Rajandran <i>et al.</i> , 2011
pGlnZB	Km ^r . (pET28a) Expressa GlnZB (1-48 de GlnZ e 49-102 GlnB de <i>A. brasilense</i>).	Rajandran <i>et al.</i> , 2011
pSMA4 D68S/Q39L	Km ^r . (pET28a) Expressa GlnZ D68S/Q39L de <i>A. brasilense</i> .	Rajandran <i>et al.</i> , 2011
pMSA4 D68S/D93P	Km ^r . (pET28a) Expressa GlnZ D68S/D93P de <i>A. brasilense</i> .	Rajandran <i>et al.</i> , 2011
pMSA4 D95P	Km ^r . (pET28a) Expressa GlnZ D95P de <i>A. brasilense</i> .	Rajandran <i>et al.</i> , 2011
pMSA4 Q39P	Km ^r . (pET28a) Expressa GlnZ Q39P de <i>A. brasilense</i> .	Rajandran <i>et al.</i> , 2011
pMSA4 S52V/S54D	Km ^r . (pET28a) Expressa GlnZ S52V/S54D de <i>A. brasilense</i> .	Rajandran <i>et al.</i> , 2011

pET28aGlnBAbV52SD54S	Km ^r . (pET28a) Expressa GlnB duplo mutante (V52S, D54S) de <i>A. brasilense</i> .	Cedido por Stets, M. I.
pBAD33-TesA	Cm ^r . (pBAD33) Expressa TesA de <i>E. coli</i> . Promotor <i>araBAD</i> .	Lennen <i>et al.</i> , 2010
pBAD33-ACC	Cm ^r . (pBAD33) Expressa ACC de <i>E. coli</i> . Promotor <i>araBAD</i> .	Lennen <i>et al.</i> , 2010
pDOP1	Amp ^r . Expressa GlnD de <i>E. coli</i> . Promotor P _L .	Kamberov <i>et al.</i> , 1994
pDK5PII		

4.2 PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS

Os plasmídeos foram purificados conforme Sambrook *et al.*, 1989, ou alternativamente purificado com a utilização de kits GE healthcare.

4.3 AMPLIFICAÇÃO, RESTRIÇÃO, LIGAÇÃO DE DNA E TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

Reações de PCR foram feitas com iniciadores sintetizados pela Invitrogen. As reações foram feitas em tampão sugerido pelo fabricante das enzimas Taq polimerase/PFU DNA polimerase (Invitrogen e Fermentas) com adição de 0,2 mM de dNTPs, 10 picomols de cada iniciador (5' e 3'), 1,5 mM de MgCl₂, cerca de 20 ng de DNA molde e 1U de enzima DNA polimerase para um volume final de 25 µL. Os parâmetros de amplificação em termociclador foram: 30 ciclos de desnaturação, anelamento e alongamento, os quais possuem parâmetros de tempo e temperatura indicados conforme fabricante dos iniciadores e fornecedores de Taq DNA polimerase/PFU DNA polimerase (Invitrogen e Fermentas).

Endonucleases de restrição foram utilizadas conforme indicações do fabricante. Foram utilizadas enzimas da Invitrogen e Fermentas.

O vetor plasmidial e o inserto de interesse, ambos clivados com as mesmas enzimas de restrição, foram misturados em uma proporção molar 1:5, respectivamente, em tampão de ligação, no qual foi adicionado 1 unidade enzimática de T4 ligase à mistura e então foi incubada a temperatura ambiente por cerca de 16 horas.

O método para transformação bacteriana foi realizado de acordo com Chung *et al.* (1989).

4.4 ELETROFORESE DE DNA

Eletroforese de DNA foi realizada em gel de agarose horizontal conforme descrito por Sambrook *et al.* (1989). O DNA foi visualizado em transluminador de luz ultravioleta, após tratamento com brometo de etídeo (0,5 µg/mL). O perfil eletroforético foi registrado utilizando um sistema de vídeo-imagem acoplado (UVP).

4.5 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

As concentrações de proteínas foram determinadas pelo método de Bradford (1976) com o uso de reagente da SIGMA® de acordo com recomendações do fabricante. Proteínas após gel filtração foram mensuradas em nano-drop a 280nm baseado em coeficiente de extinção teórico (ExPasy).

4.6 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS

Eletroforeses de proteínas sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) foram realizadas em gel de poliacrilamida como descrito por Laemmli *et al.*, (1970). A concentração de acrilamida no gel de corrida utilizada foi de 15% (acrilamida SIGMA®), exceto para análise GlnD (10%). As eletroforeses foram feitas em sistema vertical seguindo recomendação do fabricante (Biorad).

4.7 CLONAGEM E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

As proteínas foram super-expressas em células *E. coli* BL21 (DE3) sob indução de IPTG 0,5mM por 3 horas a 37°C 120rpm em meio LB. As células foram coletadas por centrifugação e lisadas por sonicação, com 30 ciclos de 5s sonicação/5s repouso, sob amplitude de 50% em gelo e água, em aparelho sonicador MSE Soniprep 150. As proteínas super-expressas foram purificadas utilizando-se de colunas de afinidade ou colunas catiônicas em sistema automatizado de purificação FPLC AKTA UV-900 em tampão A e para a eluição linear, em coletor automático P-950, foi usado tampão B (tampão A com KCl 1M). Após eluição das frações contendo as proteínas, as frações contendo a proteína de interesse, analisadas em SDS-PAGE, foram misturadas e dializadas em tampão A com 20% de glicerol. Alíquotas de 200 µL foram estocadas a -20°C.

4.7.1 Proteínas sem cauda de afinidade

Para clonagens das proteínas GlnB e BC nativa (sem cauda de afinidade), reações de PCR foram realizadas usando DNA genômico de *E. coli* estirpe ET8000 como molde. Os *primers* para obtenção de *glnB* foram 5' GGAATCATATGAAAAAGATTGATGCG 3' (sítio de restrição *NdeI* sublinhado) e 5' CTTGAGGATCCTTAAATTGCCGCGTCGTCC 3' (sítio de restrição *BamHI* sublinhado). Para obtenção de *accC* foram utilizados os *primers* 5' GGAATCATATGCTGGATAAAATTGTTATTGC 3' (sítio de restrição *NdeI* sublinhado) e 5' CTTGAGGATCCTTATTTTCCTGAAGACCGAG 3' (sítio de restrição *BamHI* sublinhado).

Restrições dos produtos de PCR (*NdeI/BamHI*) submetidas a ligação com vetor pET29a clivado com as mesmas enzimas geraram os plasmídeos nomeados pTRPETGlnB (expressa GlnB de *E. coli*) e pTRPETBC (expressa BC de *E. coli*). Por sua vez, as proteínas CT α e CT β nativas foram subclonadas a partir dos plasmídeos pXY30 (*NdeI/EcoRI*) e pJexpress411-AccD (*NdeI/EcoRI*), respectivamente, usando pET29a como vetor, cortado com as mesmas enzimas, gerando os plasmídeos nomeados pTRPETAccA e pTRPETAccD, respectivamente.

Para purificação de GlnB de *E. coli*, super-expressa a partir de pTRPETGlnB, foi utilizada a coluna HiTrap DEAE sepharose FF 1mM (GE Healthcare) em tampão contendo Tris-HCl pH7,5, KCl 100mM, glicerol 10% em sistema AKTA, com eluição sob mesmo tampão, porém, com 1M de KCl em gradiente linear. Para purificar a proteína BC de *E. coli*, super-expressa a partir do plasmídeo pTRPETBC, foram utilizadas as colunas HiTrap Heparin HP 1mL, HiTrap DEAE sepharose FF, HiTrap Q-sepharose HP, nessa ordem, então a fração das proteínas que não ligaram nas colunas testadas, que continha BC, foi utilizada para os ensaios após diálise em tampão contendo Tris-HCl pH7,5, KCl 100mM, glicerol 10%. As subunidades da CT, CT α (pTRPETAccA) e CT β (pTRPETAccD) nativas aparentemente não super-expressaram, logo, não foram purificadas. As proteínas quiméricas de *A. brasilense* GlnBZ (aminoácidos 1-92 de GlnB e 93-102 de GlnZ de *A. brasilense* – loop-T de GlnB) e GlnZB (aminoácidos 1-48 de GlnZ, 49-102 GlnB – loop-T de GlnZ (38-48) e de GlnB (49-56)) foram purificadas em coluna HiTrap Heparin HP 1mL, em método de purificação como descrito para GlnB de *E. coli*. As demais proteínas variantes de PII de *A. brasilense* sem cauda de afinidade foram cedidas purificadas pela Dra. Edileusa Gerhardt (GlnB Δ 42-54, GlnZ, GlnZ D68S/Q39L, GlnZ S52V/S54D, GlnZ Q39K, GlnZ Q39P, GlnZ D95P, GlnZ D68S/D93P) (Gerhardt, 2015) e Dra. Maria Isabel Stets (GlnB V52SD54S, GlnB Q42HS52VS54D) em coluna de heparina em método como descrito para GlnB de *E. coli*.

4.7.2 Proteínas com cauda de histidina (His)

Proteínas PII purificadas contendo cauda de histidina purificadas foram HisGlnK e HisGlnB de *E. coli* a partir dos plasmídeos pTRPETHisGlnK e pTRPETHisGlnB (clonada como descrito para pTRPETGlnB, porém usando pET28a como vetor), respectivamente. As subunidades da ACC de *E. coli* usadas neste trabalho contendo cauda His foram HisBC (pET16b-AccC), HisBCCP (pTRPETHisBCCP – subclonado a partir de pTRPETBCCPn em vetor pET28a com enzimas *NdeI/BamHI*), HisCT (pET16b-AccAD), HisCT α e HisCT β . Tais proteínas contendo cauda His foram purificadas usando coluna HiTrap Chelating HP 1mL (GE Healthcare) carregada com NiCl₂ 0,1M conforme indicação do fabricante usando tampão A (Tris-HCl pH 7,5, KCl 100mM, glicerol 10%) para equilibrar a coluna e tampão A acrescido de 500mM de imidazol para eluição (acrescido

de 1mM de DTT para purificação das subunidades da ACC) em FPLC. As proteínas PII de *A. brasilense*, HisGlnB e HisGlnZ, obtidas a partir de pMAMLV1 e pMSA3, respectivamente, foram cedidas purificadas pela Dra. Luíza Araújo (Moure *et al.*, 2012).

4.8 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA ENSAIOS DE CRISTALIZAÇÃO

4.8.1 Gel filtração

Preparação de proteínas voltadas à cristalização foram purificadas conforme indicado na respectiva figura dos experimentos. Ensaio de gel filtração foram realizadas em colunas HiTrep 16/60 Sephacryl S-300 (GE-Healthcare), Superose 12 10/300 (GE-Healthcare) ou em coluna Superose 6 10/30 (GE-Healthcare) conforme indicações do fabricante em FPLC AKTA purifier UV-900, coletor automático P-900 (GE-Healthcare).

4.8.2 Purificação do complexo BC-BCCP-II

As proteínas BC, BCCP e HisGlnB foram expressas em BL21*star* (DE3) separadamente e seus extratos, provenientes de 1L de cultivo cada em meio LB, foram também separadamente preparados. Após sonicação em tampão de interação (ATP 3.5mM, MgCl₂ 5mM, glicerol 5%, imidazol 20mM, DTT 1mM) e centrifugação a 20000g por 45 min, todo o volume de extrato de GlnB e de BCCP somados a 1/5 do volume de extrato de BC foram incubados em tampão de interação acrescidos de 4 mL de resina de níquel por 40 minutos em 250 mL de volume final a 4°C sob leve agitação orbital. Então a resina de níquel foi coletada por filtração e lavada com 40mM de imidazol acrescido em mesmo tampão de interação. Em seguida, as proteínas foram eluídas com 6mL do mesmo tampão contendo 300mM de imidazol. Uma coluna HiTrep 16/60 Sephacryl S-300 HR (GE-Healthcare) foi carregada com o eluato para gel filtração em tampão de interação.

4.8.3 Purificação de GlnD

A proteína GlnD de *E. coli* foi purificada em sua forma nativa (sem cauda de afinidade) através do plasmídeo pDOP1 em células BL21*star*(DE3). Após o cultivo a 37°C e 200 rpm atingir DO₆₀₀=0.5 a temperatura foi alterada para 42°C e depois de 3 horas as células foram coletadas por centrifugação, sonificadas em tampão de sonicação (Tris-HCl pH 7.5 50mM, KCl 50mM, Glutamina 5mM, DTT 1mM) e após centrifugação de 20.000g por 45min a 4°C o sobrenadante foi recuperado e submetido a duas colunas acopladas de HiTrap Heparin HP (GE Healthcare) 5mL, as quais foram

lavadas com tampão de sonicação contendo 20% de 1M KCl e depois a proteína foi eluída em 6mL de tampão de sonicação contendo 50% de KCl 1M. O eluato foi adicionado a coluna HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 HR (GE Healthcare) para gel filtração.

4.9 BIOTINILAÇÃO

A biotinilação de BCCP foi realizada conforme descrito por Chapman-Smith *et al.*, 1994. O estado de biotinilação BCCP foi avaliado por espectrometria de massa MALDI/TOF-MS/MS, conforme descrito em nosso trabalho anterior (Rodrigues *et al.*, 2014) ou por ensaio de gel *shift* ou western blot.

4.9.1 Gel Shift

Para avaliação do estado de biotinilação de BCCP foi utilizado, também, o seguinte método: Foi adicionada streptavidina monomérica em excesso às amostras antes de serem aplicadas no gel SDS-PAGE e após fervura a por 5 minutos em tampão de amostra (concentrações finais: Tris-HCl 62.5mM pH6.8, SDS 2.5%, β -mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0,002%, glicerol 10%). Deste modo, se pode observar o descolamento de massa no gel, da altura esperada de BCCP para a altura esperada de BCCP (~17kDa) + streptavidina (55kDa).

4.10 PROTEÓLISE LIMITADA DE BCCP

BCCP biotinilada, purificada em coluna HiTrap Heparin HP 1mL (GE-Healthcare) e previamente testada em ensaio de *pull down* contra HisGlnB, foi usada sob concentração de 1mg/mL em solução contendo 1 μ g/mL de subtilisina ou quimotripsina para reação de proteólise realizada em tampão 20mM HEPES pH 8 com 0,5mg/mL de enzima proteolítica. Incubação a 4°C para subtilisina ou temperatura ambiente para quimotripsina por aproximadamente 16 horas, coletando-se amostras de 10 μ L nos tempos de 1, 2, 10, 30, 60, 120, 240 minutos após início de reação para análise em SDS-PAGE. Após incubação de 16h às amostras foram adicionadas inibidor de proteólise PMSF fresco para 1mM e mantidas no gelo para ensaios de interação.

4.11 ENSAIO DE INTERAÇÃO – *PULL DOWN*

Para ensaio de interação as proteínas a serem testadas foram incubadas, sob concentração proteica indicada nas figuras, por 15 minutos em 500 μ L de tampão de interação (Tris-HCl pH 7,5

50mM, KCl 100mM, MgCl₂ 5mM, imidazol 10mM, ATP 3,5mM, 0,1%LDAO e 2-OG conforme indicado quando presente), com 5 µL de resina magnética de níquel (His MagTM - Agarose-Beads-Promega) pré lavada com 100 µL de tampão de interação. Após incubação, 3 lavagens com 300 µL de tampão de interação com agitação leve em vortex. A eluição foi feita com 15 µL de tampão contendo 500mM de imidazol. As amostras foram então preparadas para análise em SDS-PAGE.

4.12 ENSAIO DE ATIVIDADE DA ACC *IN VITRO*

Para ensaios *in vitro* de atividade da ACC foram misturados os componentes purificados da ACC para uma concentração final de 120 nM (monômero de cada subunidade) em volume de tampão de reação de 0,5 mL, composto por 50 mM de HEPES pH 8; 5 mM de HCO₃⁻; 5 mM de MgCl₂; 3.5 mM de ATP e 1 mM DTT com 1 µM de PII quando presente. A reação foi feita a 25°C e iniciada com a adição de 0,2 mM de acetil-CoA. Alíquotas de 40 µL foram coletadas após 10 minutos e adicionadas imediatamente em solução contendo ácido acético para concentração final de 50% (v/v) e 15µM de 3-¹³C-malonil-CoA (Sigma) como padrão interno. As amostras foram analisadas por LC/MS.

4.12.1 LC/MS

Os metabólitos totais de *E. coli* foram separados usando um aparelho UFLC Prominence (Shimazu) contendo uma coluna C18 2,6 µm 50 x 2,1 mm (Phenomenex) mantida a 40°C. A fase móvel consistiu de 15 mM de ácido acético e 10 mM de tributilamina (solvente A) ou metanol (solvente B). As amostras foram colocadas em *vials* e mantidas a 4°C em um aplicador automático de amostras que injetou 10 µL de amostra para corrida de 0.2 mL/minutos em duplicata, intercalando uma injeção de água entre corridas. Os metabólitos foram eluídos da coluna usando um gradiente linear de solvente B (0-100%) em 20 minutos. A coluna foi pré-equilibrada com solvente A por 10 minutos.

A detecção dos metabólitos foi feita por acoplamento ao LC com um MicroQTOF-QII (Bruker Daltonics), equipado com uma fonte de ionização eletrospray em modo negativo. Íons carregados negativamente foram detectados dentro de uma faixa de m/z de 50 a 1000 a cada segundo. A voltagem de capilaridade foi mantida a -3500V, a pressão da bomba de nitrogênio foi mantida em 2,0 bar e o gás de secagem em 6 litros por minuto, a 180°C. Sempre antes da análise dos metabólitos no LC/MS o equipamento foi calibrado com padrões de massa. Soluções padrão de ADP, acetil-CoA e malonil-CoA (Sigma) foram preparados na hora do uso e misturados para concentrações finais de 5, 10, 25, 35, 50, 75 e 100 µM para cada metabólito, assim, foi possível verificar o tempo de retenção e gerar

uma curva padrão de cada composto. A curva padrão foi gerada usando uma regressão linear e obteve-se um $R > 0,99$ para todos os compostos. Para quantificação de malonil-CoA foram comparados os picos integrados do padrão interno 3- ^{13}C -malonil-CoA com os picos integrados de malonil-CoA formado experimentalmente.

4.13 SCANNER DE LÂMINAS

Para visualização das células foram utilizados um *scanner* MIRAX Scan (Carl Zeiss TM) e um microscópio Olympus BX 61 TM para fotografar as células ET8000, PT8000 e FT8000 em aumento de 100x. As células foram cultivadas conforme item 3.15.1. Foram adicionados 10 μL de cultivo crescido até $\text{DO}_{600} = \sim 0,5$ em lâmina histológica sem adição de corantes e imediatamente foi adicionada a lamínula sobre a gota de células e vedada com esmalte. As lâminas foram deixadas a 4°C durante a noite para estabilizar o movimento das células.

4.14 PESO SECO

Para determinação do peso seco foram coletados 40-50mL de cultivo em duplicata e adicionados em tubos previamente pesados em balança analítica. Os tubos foram centrifugados a 3.000g por 30 minutos a 2°C. Os *pellets* obtidos foram ressuspensos em água gelada (no gelo), centrifugados novamente e incubados a 80°C durante a noite. O peso seco foi determinado pela diferença no peso dos tubos antes e depois da secagem.

4.15 ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS EM GC/MS

4.15.1 Células e cultivo

Para análise dos ácidos graxos de *E. coli* células ET8000 (wt), PT8000 ($\Delta glnB$) e FT8000 ($\Delta glnB/glnK$), cultivadas a 120rpm, 37°C, na presença de NaI^r não-transformadas e transformadas com plasmídeo pBAD-TesA (Cm^r) foram cultivadas a partir de colônias frescas em 10mL de LB durante o dia com antibióticos. Desta cultura durante o dia, 100 μL foram adicionados em 10mL de meio M9- NH_4Cl 30mM com antibióticos e cultivados durante a noite. Após crescimento durante a noite, 100mL de meio acrescido de 0,4% de L-arabinose (para indução da expressão de TesA) foram inoculados com quantidade necessária para se iniciar cultivo a uma DO_{600} teórica de 0,05. Após este cultivo atingir $\text{DO}_{600} \sim 0,5$ (fase log), 2,5mL foram coletados para extração de ácidos graxos, 40mL foram coletados para determinação do peso seco e 2mL para análise de proteínas, citometria de fluxo

e microscopia. Coletas de amostras para análises foram feitas em duplicata.

4.15.2 Extração e processamento de ácidos graxos

A extração e metilação de ácidos graxos, procedimentos baseados em Lennen *et al.* (2010), foi realizada pela adição de 5 mL de metanol:cloróformio 1:1 em 2,5mL de cultivo de células. À amostra foi adicionado 30µL de ác. pentadecanóico 10mg/mL (Sigma) dissolvido em etanol como padrão interno. Após vortexar bem, as amostras foram centrifugadas por 20 min, a 20°C, a 3000g, e então a fase clorofórmica (fase inferior) foi coletada, a qual foi submetida a secagem em corrente de nitrogênio. Foi adicionado 500µL de metanol-HCl 1M às amostras as quais foram então incubadas por 2 horas a 80°C para metilação. Depois do esfriamento da amostra, foi adicionado 500µL de hexano e a fase hexanólica (fase superior) foi coletada para análise no GC/MS.

4.15.3 GC/MS

Para análise de ácidos graxos foi realizada cromatografia gasosa em GC Varian Cp-3800 acoplado a um espectrômetro de massa MS4000 com análise de massa tipo *ion trap*. A coluna utilizada foi DB1 (25m x 0.25mm) com método programado para aquecer a amostra de 50 a 250°C (20°C/min) em corrida de 25 minutos. Injeção modo *split* de 1:9 (1µL) em injetor a 250°C. O gás de arraste utilizado foi gás hélio a 1mL/min. Os ácidos graxos foram identificados pelo padrão de espectro de ionização (The AOCS Lipid Library). A quantificação, baseada em Lennen *et al.* (2010), foi realizada pela comparação da integração dos picos obtidos com picos do padrão interno e padrão externo (nº 04111604FAME C4-24 – Sigma Aldrich). Normalização das concentrações foi baseada na concentração do padrão interno. Valores representados em mg de FFA por mg de peso seco (R) foram calculados de acordo com a seguinte formula: $R.p=(0,3.a)/A$ (O valor de 0,3 é a concentração em mg do padrão interno adicionado no início da preparação da amostra; *a* corresponde a área do pico correspondente ao pico obtido do FAME identificado; *A* corresponde a área do pico obtido do padrão interno (C15:0) identificado; *p* é o peso seco em mg correspondente a 2,5 mL de cultivo).

4.16 ANÁLISE DA FORMAÇÃO *IN VIVO* DE MALONIL-CoA SOB SUPER-EXPRESSÃO DE GlnB.

4.16.1 Células e cultivo

A estirpe de *E. coli* FT8000 ($\Delta glnB/glnK$) transformada com plasmídeo pBAD33-ACC

(expressa ACC de *E. coli* – promotor *araBAD*) ou com pBAD33-ACC e pDK5PII (expressa GlnB de *A. brasilense* – promotor *tac*) foram cultivadas a partir de colônias frescas em 10mL de LB durante o dia com antibióticos. Desta cultura durante o dia, 100µL foram adicionados em 10mL de meio M9-NH₄Cl 30mM com antibióticos e cultivados durante à noite. Após crescimento durante à noite, 50mL de meio acrescido de 0,2% de L-arabinose (para indução da expressão de ACC) e 0,1mM do IPTG (para indução da expressão de GlnB) foram inoculados com quantidade necessária para se iniciar cultivo a uma DO₆₀₀ teórica de 0,05, em duplicata. Após DO₆₀₀ ~0,5 (fase log), foram usados em duplicata, 50mL para mensurar peso seco e 15mL para extração dos metabólitos, para análise em LC/MS, em duplicata, e imediatamente mantidos em mistura fria (gelo, etanol e NaCl) (~ -10°C) até início do processamento.

4.16.2 Extração dos metabólitos

O volume de 15mL de cultivo coletado foi centrifugado por 15 minutos, a 4°C, a 3000g, então o *pellet* de células foi ressuscitado em 60µL de tampão de extração (metanol:acetonitrila:água 2:2:1, mais 15µM de 3-¹³C-malonil-CoA como padrão interno), a amostra foi centrifugada a 14000g por 3 minutos, o sobrenadante foi coletado e o *pellet* foi mais uma vez ressuscitado em 60µL de tampão de extração para coleta do sobrenadante após centrifugação. Os dois sobrenadantes foram misturados e analisados em LC/MS (item 3.12.1).

4.17 CITOMETRIA DE FLUXO

Um citômetro de fluxo BD Accuri C5® (USA) equipado com laser de 488-nm de excitação de fluorescência foi usado para analisar células, sem adição de agentes fluorescentes, para contagem e determinação comparativa do tamanho celular e histogramas de contagem/FSC-H. Foram programados fluxo em modo rápido (66 µL/min) e limite de volume de 50 µL com células diluídas 100x a partir de DO₆₀₀ ~0,5 (fase log). Os *gates* determinados para as populações de células, em histogramas SSC-H/FSC-H, foram limitados para 7500 no eixo FSC-H. A obtenção das medianas de FSC-H possibilitou a determinação do tamanho comparativamente entre as populações de células analisadas. Análise estatística ANOVA de duas vias foi usada, considerando p<0,05. Calibração foi determinada usando *beads* de 8 picos (BD Accuri™, USA) de acordo com fabricante.

4.18 WESTERN BLOT

Para avaliação do estado de biotinylation BCCP nativa foram realizadas eletroforese SDS-PAGE em gel 15% de acrilamida. As amostras foram preparadas a partir de 1mL de cultivo celular a $DO_{600} \sim 0,5$, as quais foram centrifugadas por um minuto a 14000g e os *pellets* de células foram ressuspendidos em 50 μ L de tampão de amostra 1x. As amostras foram imediatamente incubadas a 100°C por 10 minutos e centrifugadas por um minuto a 14000g para que fosse usado 15 μ L do sobrenadante para aplicar no gel e iniciar a corrida a 160V por 50 minutos em aparato BioRad. Após isso, foi realizada a transferência das proteínas do gel para membrana de PVDF (Hybond-ECL GE Healthcare) em sistema de transferência horizontal semi-seco no qual a placa do ânodo foi adicionada papel filtro previamente imersas em tampão A1 (tris-HCl pH 10 0,3M, metanol 20%). Outra camada de papel filtro contendo tampão A2 (tris-HCl pH 10 25mM, metanol 20%) foi colocada no sistema, seguido da membrana de PVDF previamente ativada em metanol e imersa no tampão A2. O gel, banhado em tampão C (tris-HCl pH 10 25mM, ácido capróico 40mM, metanol 20%) foi então colocado sobre a membrana seguido de papel filtro previamente imersos em mesmo tampão. A placa do cátodo foi colocada sobre as folhas de papel filtro e então o sistema foi conectado a uma fonte de eletroforese a 80mA por 1 hora. Após transferência, a membrana foi bloqueada com TBST (1x com 0,1% de tween 20 e 5%BSA) por 1h, incubada com streptavidina-HRP 1:10000 em TBST (1x com 0,05% de tween 20 e 1%BSA) por 40 minutos. Duas lavagens de 15 minutos foram feitas com TBST (1x com 0,05% de tween 20) seguida de revelação com sistema ECL (GE Healthcare) conforme indicação do fabricante, em sistema de análise de imagens UVP.

4.19 ENSAIO DE URIDILILAÇÃO

Foram adicionados 60 μ M de GlnB e 0.1 μ M de GlnD de *E. coli* em tampão contendo Tris-HCl pH 7.5 100mM, KCl 100mM, MgCl₂ 2.5mM, DTT 1mM, BSA 0.3 mg/mL, ATP 1mM, 2-OG 10mM. Então foi realizada pré-incubação por 5 minutos a 30°C. Então foi adicionado 50mM de UTP para iniciar a reação e após 5, 10 e 30 minutos foram coletadas amostras e adicionadas em tubos contendo EDTA 25 μ M para parar a reação. Amostras analisadas em Native-PAGE.

4.20 CRISTALIZAÇÃO DE GlnD

Para triagem de cristais de GlnD foram utilizadas preparações de proteínas recém purificadas (sem processo de congelamento) para incubação pelo método de difusão de vapor em gota sentada, com soluções providas pelos kits comerciais (Hampton Research) PEG/Ion, INDEX; JCSG I e II, Wizard I, II e III e Crystal Screen Cryo. A condição de cristalização encontrada e reprodutível foi usando 10mg/mL de GlnD em 0.2 M de Citrato de potássio tribásico monoidratado, 20% (p/v) de

polietilenoglicol (PEG) 3350 com auxílio de robô nanopipetador (Mosquito[®]) (0,05:0,05 μ L) (40 μ L de solução de precipitação no reservatório) e incubação a 20°C. Reproduções dos cristais foram realizadas sob método manual de pipetagem (1:1 μ L), com 40 μ L de solução de precipitação no reservatório. Os experimentos de otimização de cristais foram realizados modificando os parâmetros de concentração de PEG 3533 (10, 15, 20, 25% (p/v)) e de proteína (2, 8, 10, 15 mg/mL). Análises de difração dos cristais obtidos foram realizadas em difratômetro Rigaku. A coleta de dados foi realizada no sincrotron APS, Chicago-IL-EUA.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 INTERAÇÃO GlnB-BCCP-BC *IN VITRO*

As proteínas PII são proteínas transdutoras de sinais responsivas aos níveis intracelulares de ATP, ADP e 2-OG de forma alostérica e (Huergo, Chandra & Merrick, 2012), indiretamente, responsiva também aos níveis de glutamina, pela mediação da GlnD, que catalisa a uridililação/desuridililação de PII em resposta a glutamina (Engleman & Francis, 1978; Jiang, Peliska & Ninfa, 1998). Em *E. coli*, as proteínas PII, GlnK e GlnB, são descritas como principalmente envolvidas em funções relacionadas com o metabolismo de nitrogênio, funções que se justificam pelo fato de 2-OG e glutamina serem metabólitos indicadores do estado de nitrogênio celular. Além disso, uma vez que as proteínas PII respondem alostericamente aos níveis de ATP e ADP, atuam de acordo com os níveis energéticos celulares (Xu *et al.*, 1998; Truan *et al.*, 2010; Rajandran *et al.*, 2011; Jiang & Ninfa, 1998; Jiang & Ninfa, 2007; Fokina *et al.*, 2010; Engleman & Francis, 1978).

O 2-OG é considerado indicador dos níveis de nitrogênio celular devido suas concentrações flutuarem de forma inversamente proporcional às concentrações de glutamina no sistema GS/GOGAT de assimilação de nitrogênio. Contudo, o 2-OG, é uma molécula diretamente envolvida no metabolismo de carbono, pois é intermediário do ciclo de Krebs, via central do metabolismo de carbono. Quando glucose é a fonte de carbono sob condições aeróbicas em *E. coli*, esta molécula é oxidada a acetil-CoA, que em sua maior parte é direcionada ao ciclo de Krebs (Huergo & Dixon, 2015). Em células submetidas a crescimento sob privação de carbono, ocorre um rápido e significativo aumento nos níveis de 2-OG quando glucose é fornecida às células (Zhang & Ye, 2014), uma clara evidência de que 2-OG também pode ser um indicador dos níveis de carbono na célula. Portanto, uma vez que as proteínas PII atuam de acordo com os níveis intracelulares de 2-OG, pode-se considerar que, PII pode atuar de acordo com os níveis de carbono e nitrogênio.

O primeiro relato corroborando PII como proteína regulando metabolismo de carbono na célula se deu em *Arabidopsis thaliana*, pela demonstração da inibição *in vitro* da atividade da acetil-CoA carboxilase na presença de PII, pela interação de PII com BCCP (Feria Bourrellier *et al.*, 2010). Em nosso trabalho anterior, foi relatado que uma das proteínas PII de *E. coli*, a GlnK, possui capacidade de interação com BCCP, e que, assim como em plantas, essa interação mostrou-se ser dependente de MgATP e prevalentemente desfavorecida por 2-OG *in vitro* de forma dose dependente (Rodrigues *et al.*, 2014). No entanto, a atividade da ACC não apresentou diminuição na presença de GlnK. Sendo assim, no presente trabalho foi proposto que a proteína GlnB poderia ser a proteína

fisiologicamente relevante a interagir com BCCP e causar possível efeito inibitório à ACC, assim como encontrado em *A. thaliana* (Feria Bourrellier *et al.*, 2010).

Em uma primeira abordagem experimental neste trabalho, foi realizado ensaio de *pull down* para verificação da interação entre GlnK, BCCP e BC, usando HisBC como proteína-isca e BCCP e PII como proteínas-presa. Na figura 19A está representado o resultado do experimento de *pull down*, em que nas linhas 1 e 5 se tem a eletroforese SDS-PAGE de amostras provenientes de incubação de AbGlnZ (*Ab* – *Azospirillum brasilense*) (linha 1) e de EcGlnK (*Ec* – *E. coli*) (linha 5) com o complexo HisBC-BCCP de *E. coli*, sob condições favoráveis de interação (presença de MgATP e ausência de 2-OG), e não se observam bandas de GlnZ nem de GlnK. A não interação de GlnK/GlnZ com o complexo HisBC-BCCP pode então explicar porquê não houve inibição da atividade da ACC na presença de GlnK (Rodrigues *et al.*, 2014). Por sua vez, nas linhas 3 e 7 da figura 19A foi possível verificar bandas correspondentes a GlnB de *A. brasilense* (linha 3) e de *E. coli* (linha 7), significando que HisBC foi capaz de co-precipitar a GlnB com BCCP no ensaio de *pull down* na presença de MgATP. Tais interações não foram verificadas na presença de 2-OG (linhas 4 e 8), pois mesmo na presença de MgATP, a ausência ou presença de 2-OG é determinante para a interação, positiva ou negativamente, respectivamente.

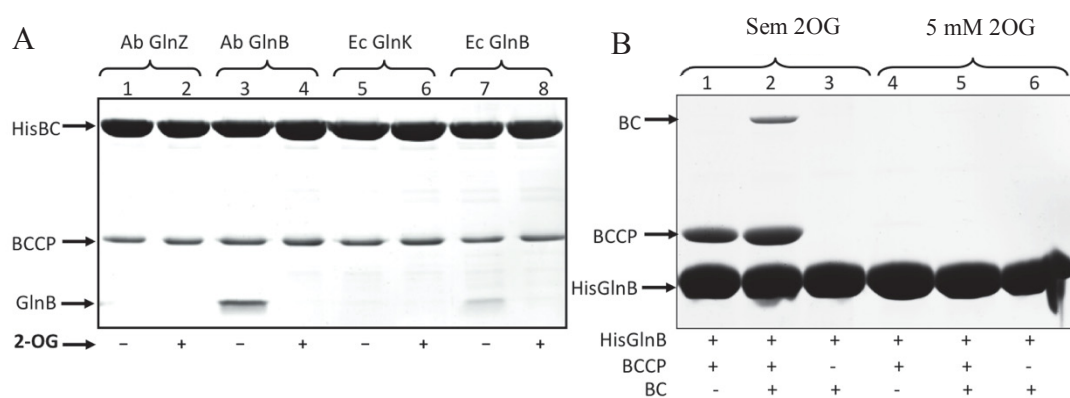


FIGURA 19. Interação entre GlnB e complexo BC-BCCP. Ensaio de *pull down*. SDS-PAGE. Coomassie Blue. **A.** Imobilização de HisBC Ec (10µg) em resina magnética de níquel ((5µL) (Promega) pré-lavada com 100 µL de tampão de interação (Tris-HCl pH 8 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, imidazol 20 mM, LDAO 0,1% (m/v), glicerol 10%, ATP 3,5 mM)) e incubados com BCCP Ec (10µg) e proteína PII (15µg) indicada na figura. Nas linhas 2, 4, 6 e 8 foi realizado o ensaio com tampão de interação contendo 2-OG 2 mM. Após 3 lavagens com 300 µL de tampão de interação a eluição foi realizada com tampão de interação contendo 500 mM de imidazol e todo o volume eluído (15µL) foi submetido à SDS-PAGE **B.** Assim como descrito em A, HisGlnB Ec (5µg) foi imobilizada em resina magnética de níquel e incubada com BCCP Ec e/ou BC nativa (15µg) de acordo com o indicado pelos sinais + (presente) e – (ausente).

No seguinte experimento de *pull down*, realizado após construção de plasmídeos para expressar HisGlnB e BC nativa de *E. coli*, foi possível a confirmação da formação do complexo ternário entre GlnB, BCCP e BC de *E. coli*, usando HisGlnB como isca, como mostra a figura 19B.

A interação entre HisGlnB e BCCP foi confirmada na linha 1 (Fig. 19B). Na linha 2 pode-se observar bandas correspondentes as 3 proteínas incubadas na presença de MgATP, HisGlnB, BCCP e BC, indicando formação de complexo ternário entre elas, complexo o qual ocorre pela intermediação de BCCP, que interage com HisGlnB e BC, pois na linha 3 se tem HisGlnB e BC incubadas e não se observa interação. As mesmas condições das linhas 1, 2 e 3, porém, na presença de 2-OG, foram aplicadas nas demais linhas do gel (4, 5 e 6) em mesma ordem.

A interação entre GlnB, BCCP e BC foi avaliada em diferentes concentrações fisiologicamente relevantes de 2-OG (Fig. 20). Aparentemente, a concentração testada mais efetiva na redução da afinidade entre as proteínas foi a de 500 μ M. Assim, conclui-se que conforme a ocupação dos sítios de ligação de 2-OG em GlnB se tem maior desfavorecimento da formação de complexo com BCCP-BC, sendo a concentração crítica, para o desfavorecimento da interação, maior que 100 e menor ou igual a 500 μ M de 2-OG.

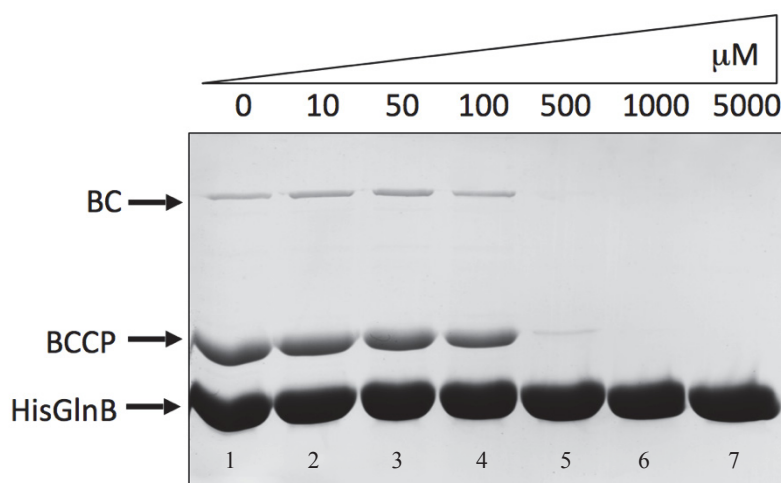


FIGURA 20. 2-OG desfavorece a formação do complexo ternário GlnB-BCCP-BC de forma dose dependente em *E. coli*. Linhas 1-7 sob concentrações de 0-5mM de 2-OG conforme indicado. Ensaio de *pull down*. HisGlnB Ec (5 μ g) imobilizada em resina magnética de níquel (5 μ L) (Promega) pré-lavada com 100 μ L de tampão de interação (Tris-HCl pH 8 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, imidazol 20 mM, LDAO 0,1% (m/v), glicerol 10%, ATP 3,5 mM) incubada com BCCP Ec (10 μ g) e BC (15 μ g) nativas. Após 3 lavagens com 300 μ L de tampão de interação a eluição foi realizada com tampão de interação acrescido de 500 mM de Imidazol e todo o volume eluído (15 μ L) foi submetido à SDS-PAGE e corado com Coomassie blue.

Em ensaio de interação usando a GlnB de *E. coli* não-uridililada e uridililada (GlnB-UMP₃) (Fig. 21) não se verifica formação de complexo ternário com GlnB-UMP₃, sugerindo que a interação entre GlnB, BCCP e BC ocorre por meio do *loop*-T de GlnB, característica que foi também observada com GlnK em interação com BCCP (Rodrigues *et al.*, 2014). Com isso, considerando que o *loop*-T possa ser a porção de GlnB a formar interface de interação com BCCP-BC, realizou-se ensaio de *pull down* utilizando proteínas PII mutantes, de *A. brasilense*, incubadas com HisBC e BCCP de *E. coli*

(Fig. 22). As linhas 1 e 2 do gel da figura 22 mostram os controles positivo e negativo de interação, respectivamente, com *AbGlnB*. Nas linhas 3 e 4 (Fig. 22) se tem resultado da co-precipitação usando HisBC-BCCP incubadas com GlnB com deleção dos resíduos 42-54 (*GlnB Δ loop-T*) e não se observa

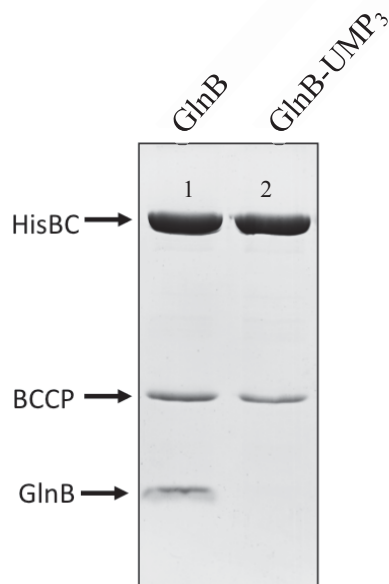


FIGURA 21. **GlnB-UMP₃ não interage com o complexo BCCP-BC.** Ensaio de *pull down*. HisBC *Ec* (10 μ g) foi imobilizada em resina magnética de níquel (5 μ L) (Promega) pré-lavada com 100 μ L de tampão de interação (Tris-HCl pH 8 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, imidazol 20 mM, LDAO 0,1% (m/v), glicerol 10%, ATP 3,5 mM)) e incubadas com BCCP *Ec* (10 μ g) e proteína GlnB (linha 1) ou GlnB-UMP₃ (linha 2) (15 μ g) de *A. brasilense*. Após 3 lavagens com 300 μ L de tampão de interação a eluição foi realizada com tampão contendo 500 mM de imidazol e todo o volume eluído (15 μ L) foi submetido à SDS-PAGE e corado com Coomassie blue.

interação, indicando que o *loop-T* é importante para a interação. Por sua vez, usando GlnB com dupla mutação, as quais substituem os resíduos de aminoácidos 52 e 54 de *AbGlnB* (D52, D54) para os resíduos de *AbGlnZ* (S42, S54), observou-se interação (linha 5) semelhante a interação com GlnB nativa (linha 1), indicando que substituição de tais resíduos não exercem efeitos na estrutura da interface de interação. A mesma substituição, dessa vez em GlnZ, para se obter GlnZ com resíduos 52 e 54 de GlnB (S52D, S54D) foi testada no ensaio de interação com HisBC-BCCP (linha 9), e tais substituições não foram capazes de tornar GlnZ capaz de interagir com HisBCCP-BC (linha 1, fig. 19A), assim como quando se utilizou GlnZ triplamente mutante (Q42H, S52D, S54D) (linha 11), não se observando interação. Por sua vez, na figura 22, a quimera GlnBZ (1-92 de GlnB e 93-102 de GlnZ de *A. brasilense*) aparentemente mostrou-se capaz de interagir fracamente com HisBCCP-BC (linha 7), mesmo na presença de 2-OG (linha 8). Considerando que em ensaios anteriores GlnBZ não se ligou na resina inespecificamente, esse resultado pode indicar alteração conformacional em PII de tal forma a diminuir a afinidade de interação PII-BCCP e ainda, possivelmente resultou em aparente perda da responsividade a 2-OG.

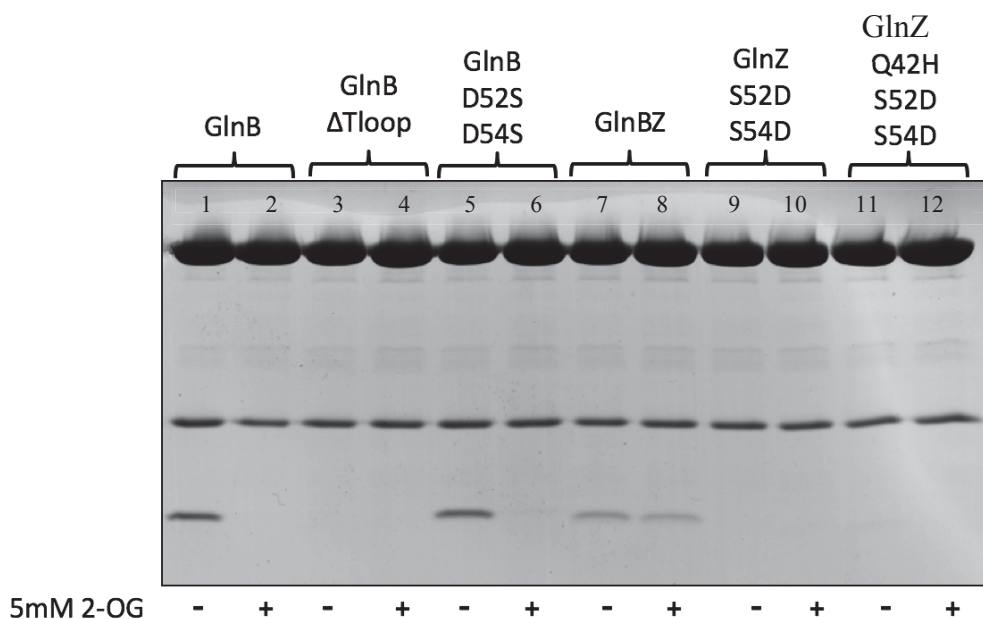


FIGURA 22. **Interação entre as proteínas PII de *A. brasilense* e BCCP-BC de *E. coli*.** Ensaio de *pull down*. HisBC *Ec* (10 μ g) imobilizada em resina magnética de níquel (5 μ L) (Promega) pré-lavada com 100 μ L de tampão de interação (Tris-HCl pH 8 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, imidazol 20 mM, LDAO 0,1% (m/v), glicerol 10%, ATP 3,5 mM) e incubados com BCCP *Ec* (10 μ g) e proteínas PII de *A. brasilense*. Após 3 lavagens com 300 μ L de tampão de interação a eluição foi realizada com tampão contendo 500 mM de imidazol e todo o volume eluído (15 μ L) foi submetido à SDS-PAGE e corado com Coomassie blue. Nas linhas 2, 4, 6, 8, 10 e 12 o ensaio foi realizado usando tampão de interação contendo 2-OG 5 mM.

Em ensaio de interação entre HisGlnB, BCCP e BC variando a taxa ATP/ADP em diferentes concentrações de 2-OG não se observa significativa alteração na capacidade de interação entre HisGlnB e BCCP-BC (Fig. complementar 4), no entanto, observa-se formação do complexo ternário HisGlnB-BCCP-BC de forma estável em ensaio de *pull down* sob concentrações de 3,5 a 1,5 mM de MgATP (Fig. complementar 3). Contudo, sob ATP 1mM o complexo HisGlnK-BCCP é estável (Rodrigues *et al.*, 2014), logo, supõe que o mesmo ocorra para o complexo PII-BCCP-BC. Além disso, foi observado uma aparente tendência ao aumento da banda de BC conforme aumento de ADP e diminuição de ADP em baixas concentrações de 2-OG (zero e 0,01mM). Não se sabe explicar essa tendência, no entanto, sabendo que BC possui também sítio de ligação à ATP, algum efeito alostérico poderia de alguma forma modificar a afinidade de BC ao complexo HisGlnB-BCCP.

Contudo, apesar de todos os dados anteriores apontarem GlnB como a proteína PII capaz de formar complexo com BCCP-BC, a proteína GlnK foi também capaz de interagir com BCCP e BC em ensaio de *pull down* quando foi utilizado GlnK com cauda His e BCCP e BC nativas (Fig. 23). No entanto, GlnK com e sem cauda His não foi capaz de inibir a atividade da ACC (Rodrigues *et al.*, 2014).

Para se avaliar a atividade da ACC *in vitro* na presença de GlnB foi realizado ensaio utilizando as subunidades da ACC (BCCP, BC e CT) purificadas, misturadas em uma proporção molar de 1:1:1 na presença e ausência de GlnB. Através da quantificação em LC/MS do malonil-CoA formado pela ACC verificou-se que a atividade da enzima ACC foi inibida em 45% pela *EcGlnB*, como mostrado

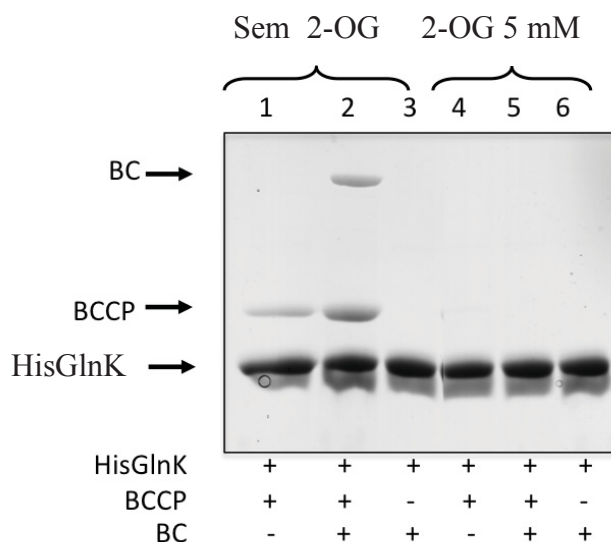


FIGURA 23. **Interação entre GlnK e o complexo BCCP-BC.** Ensaio de *pull down*. HisGlnK (5µg) foi imobilizada em resina magnética de níquel (5µL) (Promega) pré-lavada com 100 µL de tampão de interação (Tris-HCl pH 8 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, imidazol 20 mM, LDAO 0,1% (m/v), glicerol 10%, ATP 3,5 mM) e incubada com BCCP *Ec* (10µg) (linha 1) e *EcBC* nativa (15µg) (linha 2) ou somente com BC nativa, sem BCCP (linha 3). Da mesma forma, o ensaio segue a ordem nas linhas 4, 5 e 6 de acordo com sinais + (proteína presente) e – (proteína ausente), porém, com tampão acrescido de 2-OG 5mM. Após 3 lavagens com 300 µL de tampão de interação a eluição foi realizada com tampão de interação acrescido de 500 mM de Imidazol e todo o volume eluído (15µL) foi submetido à SDS-PAGE e corado com Coomassie blue.

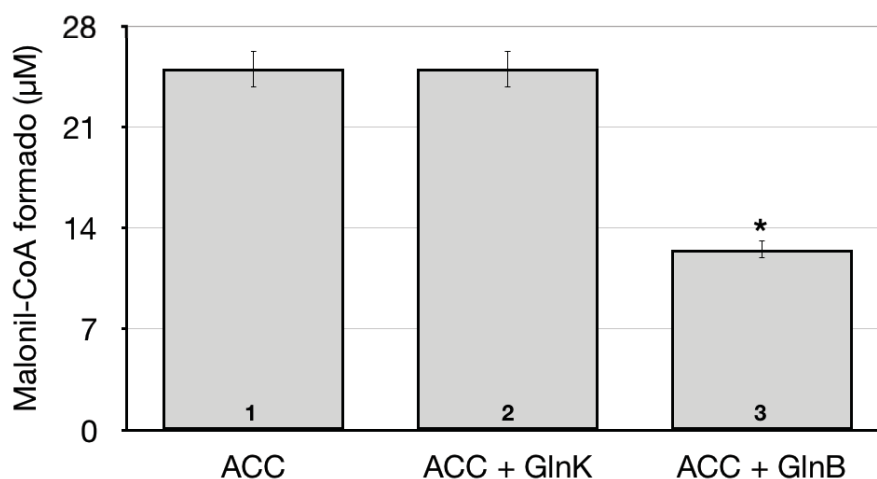


FIGURA 24. **Atividade da acetil-CoA carboxylase (ACC) na presença de GlnK e GlnB de *E. coli*.** A formação de malonil-CoA pela ACC foi medida na presença de BSA (barra 1), GlnK (barra 2) e GlnB (barra 3). GlnK e GlnB adicionados a 10 µM e BSA (em mesma quantidade p/v). A reação foi interrompida com adição de 10% (v/v) de ácido acético após 10 min. O malonil-CoA formado foi quantificado por LC-MS, com injeção de 5 µL de amostra. O ¹³C malonil-CoA foi usado como controle interno para quantificação. Teste T de Student $p < 0,05$.

na figura 24. Essa regulação parcial da ACC foi também encontrada na presença de PII em *A. thaliana* (Feria Bourrelier *et al.*, 2010). Esses dados indicam que a GlnB, e não a GlnK, é a proteína relevante fisiologicamente para a inibição da atividade da ACC *in vivo*.

5.2 IDENTIFICAÇÃO DE FENÓTIPO RESULTANTE DA INTERAÇÃO GlnB-BCCP-BC

5.2.1 Quantificação de ácidos graxos em células *E. coli* mutantes PII

A primeira etapa da síntese de ácidos graxos é catalisada pela acetil-CoA carboxilase (ACC). A formação de malonil-CoA a partir de acetil-CoA corresponde a etapa limitante da síntese de ácidos graxos (Davis *et al.*, 2000), os quais são direcionados à síntese de membrana em *E. coli*. A regulação desta enzima, a ACC bacteriana, é muito pouco conhecida, porém sabe-se que um importante mecanismo regulatório da ACC consiste em sua inibição pelo acúmulo intracelular de acil-ACPs, produtos finais da síntese de ácidos graxos, por interação direta com a ACC (Davis & Cronan, 2001; Evans *et al.*, 2017). Esse mecanismo de *feedback* negativo faz com que os níveis de malonil-CoA se mantenham baixos na célula, no entanto, é visto que ocorre um aumento dos níveis de malonil-CoA quando sob super-expressão de ACC, porém sem aumento de ácidos graxos (Davis & Cronan, 2001; Lennen *et al.*, 2010). Apenas é observado aumento na produção de ácidos graxos na célula sob super-expressão de tioesterases capazes de converter acil-ACP de cadeia longa (>C12) em ácidos graxos livres (FFA), estes, os quais são em parte excretados da célula em parte acumulados no interior celular. A super-expressão da tioesterase I de *E. coli* (TesA) resulta no consumo de acil-ACPs, e assim, leva ao aumento dos níveis de malonil-CoA e de FFA (Jiang & Cronan, 1994; Cho & Cronan, 1995; Voelker & Davies, 1994; Ohlrogge *et al* 1995).

O desenvolvimento de novas fontes de combustíveis de forma sustentável é uma necessidade devido a evidente diminuição das fontes de combustíveis fósseis no planeta. A produção microbiana de ácidos graxos tem sido bastante estudada visando otimização desse processo, e assim, a viabilização da produção de biocombustíveis após modificação química ou enzimática desses compostos, os quais são estruturalmente semelhantes aos alcanos presentes no diesel e até mesmo na gasolina (Howards *et al.*, 2013; Choi & Lee, 2013). Contudo, devido a regulação da via biossintética de ácidos graxos ser estrita, mais estudos são necessários para se conhecer melhor a regulação dessa via e otimizar a produção de ácidos graxos (Lennen & Pfleger, 2012; Janßen & Steinbüchel, 2014).

Uma vez que a inibição da ACC é sabidamente o fator limitante da formação de malonil-CoA e, assim, de ácidos graxos, a deleção/diminuição de agente inibidor da ACC levaria ao aumento de seu produto, malonil-CoA, e da produção de ácidos graxos sob super-expressão de TesA (Lennen & Pfleger, 2012). Neste trabalho, foi mostrado que a GlnB é um regulador da atividade da ACC por

meio de interação direta com BCCP. Essa interação ocorre provavelmente como uma forma de ajuste fino no controle da concentração de malonil-CoA na célula, assim, acarretando no controle da biossíntese de ácidos graxos. Para testar o efeito de PII na biossíntese de ácidos graxos foram utilizadas as estirpes de *E. coli* ET8000 (wt), PT8000 ($\Delta glnB$) e FT8000 ($\Delta glnK/glnB$) para se quantificar a produção de ácidos graxos sob super-expressão de TesA.

Na figura 30, está representado o efeito da expressão de TesA em estirpes de *E. coli* mutantes PII quanto a composição total de ácidos graxos dessas células. Neste experimento as células ET8000, PT8000 e FT8000 sob super-expressão e não super-expressão de TesA são crescidas até DO_{600} de 0,5, então delas foram extraídos os FFA totais. Esses ácidos graxos foram quantificados e identificados por GC/MS e a soma das espécies de FFA encontradas está representada em mg de FFA/mg de peso seco (Fig. 30). Pode-se verificar a maior produção total de FFA sob super-expressão de TesA pela estirpe FT8000 (0,12mg/mg) em relação a ET8000 (0,06mg/mg) e PT8000 (0,08mg/mg) sob mesma DO_{600} . E ainda, percebe-se um aumento na produção de FFA em PT8000 em relação a célula selvagem, sob super-expressão de TesA, de 25-30%.

A diferença na produtividade de FFA entre as estirpes de *E. coli* testadas sob super-expressão de TesA, não apenas se restringe às quantidades totais. Nas células testadas, foram detectados o ácido esteárico (C18:0), ácido palmítico (C16:0) e o ácido tetracanoico (C14:0), este último somente detectado em células com TesA super-expressa (célula-TesA). Sob super-expressão de TesA, foram predominantemente produzidos os FFA saturados C16:0 e C14:0, assim como em outros trabalhos (Lu *et al.*, 2008; Choi & Lee, 2013; Liu *et al.*, 2012). Tais FFA, de 14 e 16 carbonos, foram detectados em maior quantidade em PT8000-TesA e FT8000-TesA comparado ao selvagem ET8000-TesA, e ainda em maior quantidade em FT8000-TesA do que em PT8000-TesA (Fig.30C e D), sendo a produção de C18:0 equivalente em todas as estirpes testadas (Fig. 30B). O aumento observado na produção total de ácidos graxos parece ser principalmente determinado pelo aumento de C14:0, pois este FFA apresenta-se cerca de 4 vezes aumentado em FT8000-TesA (0,049mg/mg) comparado ao selvagem-TesA (0,012mg/mg) e cerca de 3 vezes aumentado em relação à PT8000-TesA (0,018mg/mg) (Fig. 30D). O ác. palmítico (C16:0) também é diferencialmente produzido por FT8000-TesA, apresentando cerca de 25% e 50% ^{*} acima do rendimento de PT8000-TesA e ET8000-TesA, respectivamente. FFA insaturados não foram obtidos sob quantidades identificáveis em GC/MS.

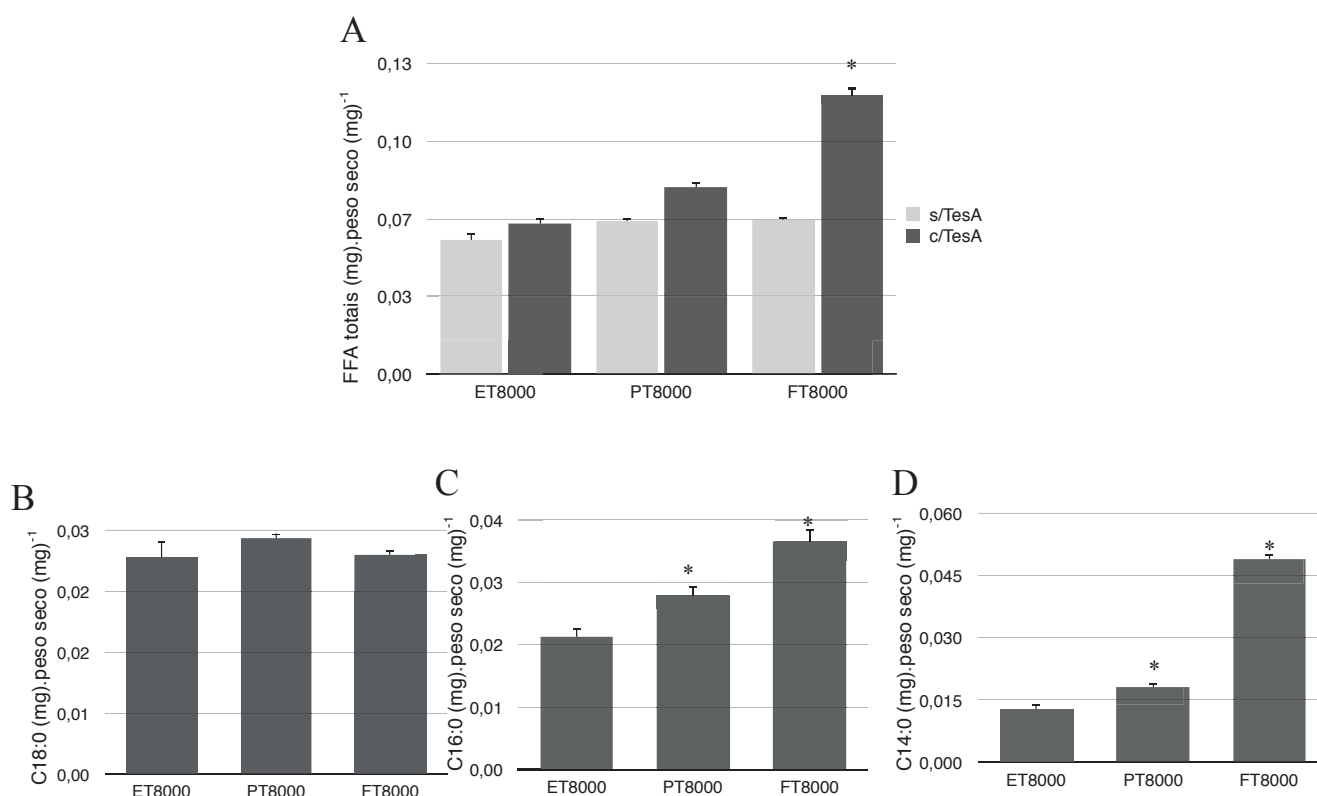


FIGURA 25- Quantificação de ácidos graxos em estirpes de *E. coli* mutantes PII sob super-expressão de TesA. Quantificação dos ácidos graxos (FFA) totais (A), ácido esteárico (C18:0) (B), ácido palmítico (C16:0) e ácido tetradecanóico (C14:0) por GC/MS. Controle interno: Ác. pentadecanóico (C15:0). Células contendo (A, B, C e D) ou não-contendo (A, como indicado) o plasmídeo pBAD33-TesA (promotor *araBAD*) cultivadas até $DO_{600} = 0,5$ em meio M9 (glucose 0,4%) suplementado com NH_4Cl 30mM e L-arabinose 0,4%. Média e S.d de experimentos em duplicata. Test-T em relação ao selvagem, $p < 0,05$.

Os resultados obtidos pela quantificação dos ácidos graxos em células mutantes PII representados na figura 30, podem ser analisados levando em conta o tempo de geração das células testadas, pois FT8000 apresentaram crescimento mais lento que as demais (Atkison & Ninfa, 1998; Reyes-Ramirez *et al.*, 2001). Neste trabalho, foi observado tempo de duplicação de FT8000 é 2,3 vezes maior que ET8000 e PT8000 (1,0h) sob condições de super-expressão de TesA. Assim, representando a quantidade de FFA em valores de produtividade específica, expressos em mg de FFA/mg de peso seco/hora de cultivo celular (Figura 26), verificamos que a célula PT8000 foi a que mais produziu ác. esteárico (C18:0) (8,3mg/g/h) (Fig. 26A), ác. palmítico (C16:0) (8,8mg/g/h) (Fig. 26B) e FFA totais (22mg/g/h) (Fig. 26D). A estirpe FT8000 apresentou maior valor de produtividade específica para o ác. tetradecanóico (C14:0) (6,5mg/g/h) em relação as demais (Fig. 26C).

Ácidos graxos de origem microbiana podem possuir diversas aplicações, como para a produção de biodiesel, cosméticos e drogas de uso farmacêutico, propiciando baixo custo efetivo de produção e menos tempo de processo (Rupilius & Ahmad, 2006; Janssen & Steinbuchel, 2014; Desbois & Smith, 2010; Jones *et al.*, 2012). A otimização da produção de ácidos graxos tem como principal objetivo viabilizar a produção de

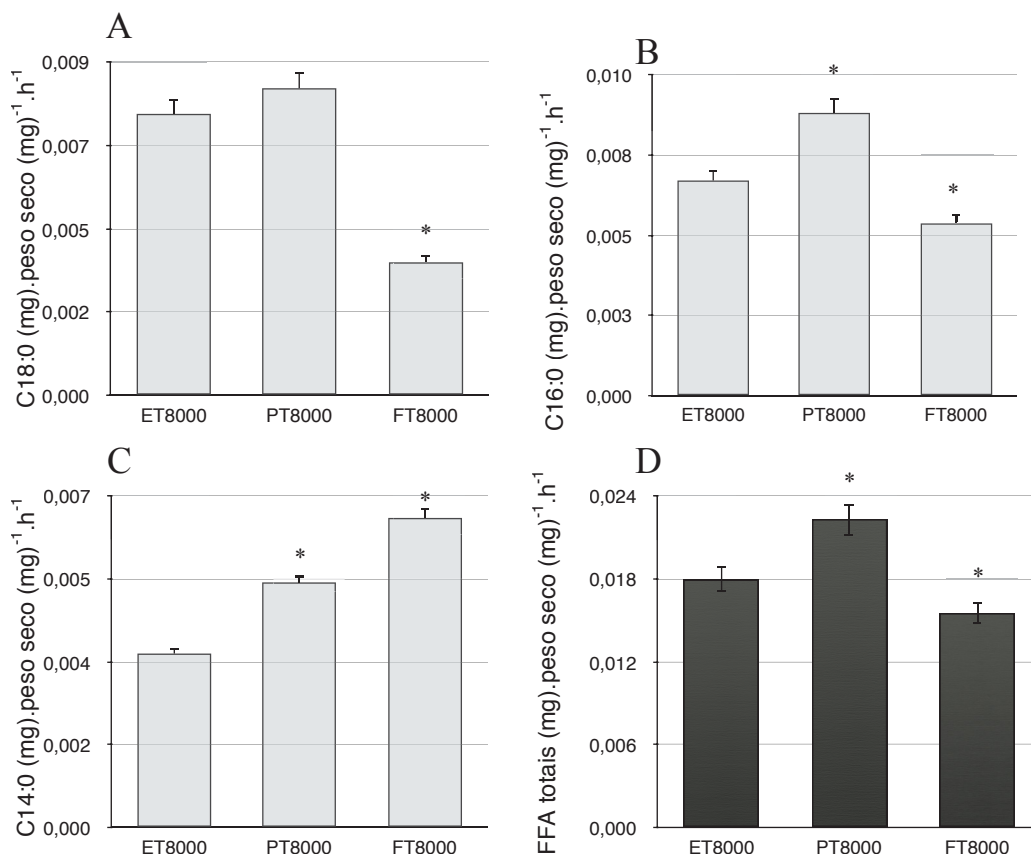


FIGURA 26- Produtividade específica de ácidos graxos em estirpes de *E. coli* mutantes PII. Quantificação dos ácidos graxos (FFA) (A), ácido esteárico (C18:0) (B), ácido palmítico (C16:0) e ácido tetradecanóico (C14:0) e FFA totais por GC/MS. Controle interno: Ác. pentadecanóico (C15:0). Células contendo ET8000, PT8000 e FT8000 contendo plasmídeo pBAD33-TesA (promotor *araBAD*) cultivadas até $DO_{600} = 0,5$ em meio M9-NH₄Cl 25mM, glucose 0,4%, L-arabinose 0,4%. Média e S.d de experimentos em duplicata. Test-T em relação ao selvagem, $p < 0,05$.

biocombustíveis. A necessidade de se desenvolver fontes alternativas e sustentáveis de combustíveis fósseis, por isso, a otimização da produção de ácidos graxos microbianos tem sido buscada e significantes progressos têm sido alcançados por meio da engenharia genética em *E. coli* (Rahman *et al.*, 2016). Modificações genéticas em *E. coli* possibilitam o desvio da produção de ácidos graxos para a produção de alcanos de cadeias mais longas (13-17 carbonos), para originar diesel, e de cadeias curtas (4-12 carbonos), para originar gasolina (Howards *et al.*, 2013; Foo *et al.*, 2014; Choi & Lee, 2013). Neste trabalho, através da super-expressão de TesA, a máxima produtividade específica total de FFA obtida foi de 0,022g/g/h pela célula PT8000, 20% a mais que a estirpe selvagem. Por sua vez, FT8000-TesA apresentou 50% de aumento da produção total de ácidos graxos (g/g) que a célula selvagem. Assim, neste trabalho sugere-se que a deleção de genes PII pode vir a conferir um significativo aumento na produção de ácidos graxos em *E. coli*.

O emprego da engenharia genética para criar uma estirpe de *E. coli* especializada na super-produção de ácidos graxos somado a métodos otimizados de cultivo descontínuo (*Fed-batch*) possibilita, atualmente, a obtenção de cerca de 2,5-7g/L de rendimento total (Lu *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2012; Dellomonaco *et al.*, 2011). O rendimento máximo de *E. coli* selvagem é de 0,02g/L de FFA (Lu *et al.*, 2008) em escala descontínua. Sob super-expressão de tioesterase e condições de cultivo descontínuo se pode produzir 12-35 vezes mais FFA do que a estirpe selvagem de *E. coli* (Lennen *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2012; Steen *et al.*, 2010). No presente trabalho, FT8000-TesA ($\Delta glnK/glnB$) apresentou rendimento 2 vezes maior que a selvagem (ET8000-TesA) sob super-expressão de TesA e condições de cultivo contínuo.

Uma explicação plausível para o maior aumento observado na produção de ácidos graxos na estirpe duplo-mutante PII ($\Delta glnK/glnB$) do que em mutante *glnB* simples, seria que devido a mutação de *glnB* levar a não-repressão de NtrC, ativando a expressão de *glnK* que, assim, assume algumas funções de GlnB (Acondéguy, 2001), como a inibição da ACC, porém, com menor afinidade, propiciando, ainda assim, maior produção de ácidos graxos que na estirpe selvagem. Contudo, conclui-se que a deleção de genes *glnK* e/ou *glnB*, pode aumentar a produção de ácidos graxos em linhagens de *E. coli* geneticamente modificadas e sob cultivo descontínuo.

Evidências de que as proteínas PII estão envolvidas na regulação da síntese de ácidos graxos foram encontradas em outros organismos. A interação entre PII e as isoformas BCCP1 e BCCP2 de cloroplastos de folhas de *Arabidopsis thaliana* foi demonstrada, bem como a inibição da atividade da ACC por PII (Feria Bourrellier *et al.*, 2010). Nesse organismo, um fator de transcrição, WRINKLED1, responsável pela ativação da glicólise e da via biossintética de ácidos graxos, também regula a expressão de GlnB (*AtGLB1*) por interação direta com a região promotora de *AtGLB1*, gerando acúmulo de GlnB nas sementes ao início da fase de maturação. Por sua vez, quando realizada a deleção de *AtGLB1*, observou-se aumento de ácidos graxos em comparação com as estirpe selvagens (Baud *et al.*, 2010).

Em cianobactéria, a identificação da interação entre PII e BCCP, bem como a caracterização da inibição da atividade da ACC por PII foi recentemente demonstrada (Hauf *et al.*, 2016). Na cianobactéria testada, *Synechocystis*, quando o gene codificante para PII foi deletado, foi observado um aumento dos níveis de ácidos graxos. Além disso, os níveis de acetil-CoA, substrato da ACC, foram drasticamente reduzidos em estirpe mutantes PII, efeito que foi revertido por complementação deste gene (Hauf *et al.*, 2016). E ainda, se tem como evidência adicional do envolvimento de PII no controle da síntese de ácidos graxos na alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*, em que a redução dos níveis de PII resultaram em aumento dos níveis de triacilglicerol (TAG) em corpos lipídicos nesta célula (Zalutskaya *et al.*, 2015). Assim, os dados encontrados na literatura suportam os dados apresentados neste trabalho. No entanto, mais estudos são necessários para o melhor entendimento

do processo de acúmulo de ácidos graxos, ligando o envolvimento de PII na regulação da ACC com o aumento desses compostos.

5.2.2- Análise do tamanho de *E. coli* mutante PII

A disponibilidade nutricional é determinante para *E. coli* regular seu tamanho e taxa de crescimento, assim, estirpe cultivadas em meio rico são maiores que estirpe cultivadas em meio pobre ou sob privação nutricional. Por sua vez, quando *E. coli* tem seu tempo de geração aumentado, apresenta diminuição em seu tamanho (Donachie, 1968), e deste modo, a bactéria coordena seu crescimento.

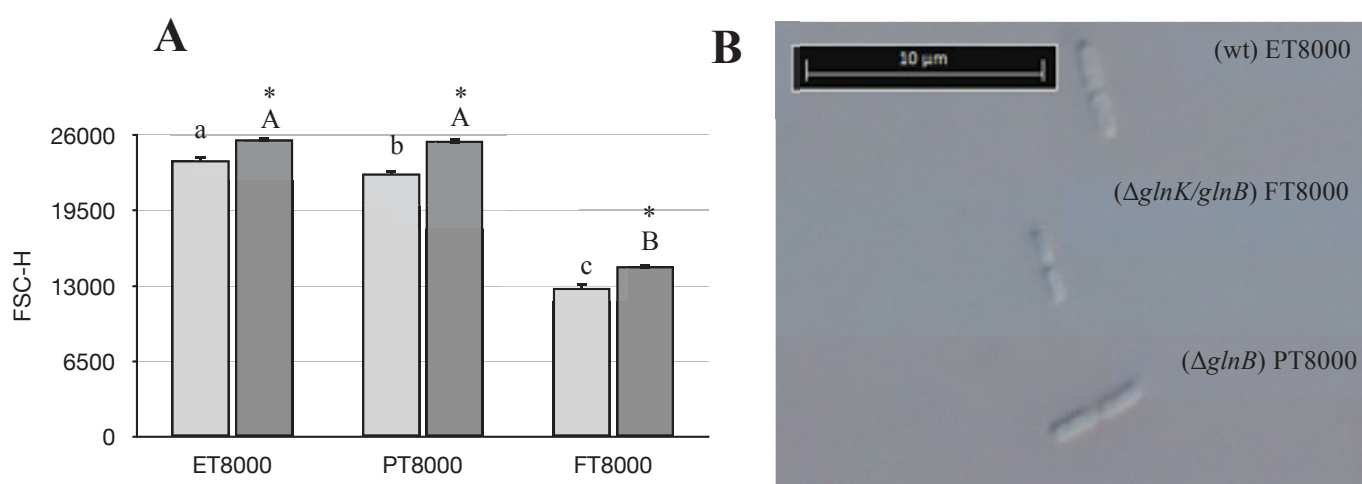


FIGURA 32- Efeito da ausência de GlnB, GlnB e GlnK e da presença de TesA no tamanho de *E. coli*. **A-** Comparação de tamanho (FSC-H) por citometria de fluxo entre as células ET8000, PT8000 e FT8000 com e sem super-expressão de TesA, como indicado. As letras a, b e c (minúsculas) indicam diferença estatística entre o tamanho de ET8000, PT8000 e FT8000 sem TesA. A letra A (maiúscula) indica mesmo tamanho entre ET8000 e PT8000 sob super-expressão de TesA e a diferença estatística destas em comparação com FT8000 sob super-expressão de TesA é indicada pela letra B (maiúsculo). Os asteriscos indicam diferença estatística no tamanho das linhagens entre si com e sem super-expressão de TesA. Experimento proveniente de 5 replicatas biológicas. Análise de variância ANOVA de duas vias e teste Turkey, $p < 0,05$. **B-** Scanner de lâmina mostrando estirpes de *E. coli* no durante a divisão celular (Yao *et al.*, 2012). ET8000 na figura micrografia superior, FT8000 na micrografia central e PT8000 na micrografia inferior. Microscópio Olympus BX 61TM em aumento de 100x.

Sabendo que as estirpe duplo-mutantes *glnK/glnB* apresentam maior tempo de geração comparado com a estirpe selvagem (Martin & Renhold-Hurek, 2002; Reyes-Ramirez *et al.*, 2001), estas estirpe foram avaliadas quanto ao seu tamanho por citometria de fluxo, como representado na figura 27A, em que se tem a mediana dos eventos em eixo FSC-H, indicativo de tamanho, para as estirpes ET8000, PT8000 e FT8000, sem e com a super-expressão de TesA (pBAD33-TesA). Assim, foi verificado que os mutantes *glnB* (PT8000) e *glnK/glnB* (FT8000) são menores que a selvagem (ET8000), em 5% e 49%, respectivamente. E ainda, sob super-expressão de TesA ocorre um aumento

das células em relação a estirpe sem super-expressão de TesA. O aumento no tamanho celular verificado foi de 7% na estirpe ET8000, de 12% na estirpe PT8000 e de 22% na estirpe FT8000 sob super-expressão de TesA. Na figura 27B, há micrografias, sob a mesma escala em máximo aumento, mostrando as estirpes ET8000, PT8000 e FT8000 no momento da divisão celular (Yao *et al.*, 2012), para representação visual de seus tamanhos.

Quando sob condições de disponibilidade de nitrogênio, condição na qual o gene *glnK* não é expresso, mutantes *glnB* podem induzir a um certo nível a expressão de GlnK, pela ausência de regulação de NtrC por GlnB. Deste modo, um maior nível de NtrC permaneceria fosforilada, ativando a expressão de genes do metabolismo de nitrogênio, entre eles *glnK*, assim, GlnK poderia atuar em complementação às funções de GlnB (Arcondéguy, 2001). No entanto, sabendo que GlnK apresenta menor afinidade a NtrC do que GlnB (Atkinson & Ninfa, 1998), espera-se, sob suficiência de nitrogênio, maior nível de NtrC fosforilada em mutante *glnB* do que no selvagem. Por sua vez, estirpe duplo-mutantes PII ($\Delta glnK/glnB$), sob condições de disponibilidade de nitrogênio, tende a apresentar comportamento de estirpe selvagem sob condições limitantes de nitrogênio, possibilitando que um maior nível de NtrC permaneça ativa (fosforilada), estimulando a expressão de genes controlados por σ^N (Reyes-Ramirez *et al.*, 2001; Atkinson e Ninfa, 1998). Desta maneira, *E. coli* reduz seu tamanho e taxa de crescimento em resposta a tais condições de estresse, a privação de nutriente, no caso, o nitrogênio. Contudo, a deleção dos genes *glnK* e/ou *glnB* pode acarretar em alguns efeitos difíceis de interpretar, uma vez que as proteínas PII estão envolvidas em uma série de processos regulatórios, os quais não são ainda totalmente conhecidos (Huergo, Chandra & Merrick, 2012).

A estirpe de *E. coli* com inserção do gene de uma tioesterase (BTE) para cada *locus* dos operons *fadD*, *fadE* e *fadAB* (Youngquist *et al.*, 2012) apresenta eliminação da via de β -oxidação, assim, aumentando a produção de ácidos graxos (Hoover *et al.*, 2011) e super-expressando BTE em alto nível. Utilizando o mesmo método, porém, com inserção do gene de uma BTE não-funcional (BTE H204A) como controle (Lennen *et al.*, 2013), e comparando o tamanho destas células, foi observado que ambas as células apresentaram o mesmo tamanho, em média, que *E. coli* selvagem em fase log, porém, em fase estacionária, fase na qual células *E. coli* selvagem reduzem em tamanho (Åkerlund, 1995), foi verificada uma tendência das células que expressam BTE a não reduzir, diminuição de tamanho a qual ocorreu nas células que expressam BTE H204A (Lennen *et al.*, 2013), assim como em *E. coli* selvagem, caracterizando heterogeneidade no tamanho celular sob super-expressão de tioesterase nessa estirpe. No presente trabalho, foi possível verificar um significativo aumento no tamanho das células nas estirpes testadas (ET8000, PT8000 e FT8000) quando sob super-expressão de TesA em comparação com as respectivas estirpes não portando plasmídeo pBAD33-TesA para expressão de TesA (Fig. 27). Essa alteração de tamanho pode ser explicada levando em conta as formas como *E. coli* transporta os ácidos graxos para o exterior da célula.

O processo de excreção de FFA em bactéria é pouco conhecido, entretanto, pode-se assumir que o transporte de FFAs para o exterior da célula ocorre de duas formas, por meio de proteínas transportadoras transmembrana (Lennen *et al.*, 2013) e por meio da livre difusão (Lennen & Pfeleger, 2012). O acúmulo de determinados compostos no interior da célula pode acarretar em efeitos tóxicos, e quando sob tais condições, a célula expressa proteínas engajadas no efluxo dessas moléculas (Isken & Bont, 1998). Por sua vez, uma vez que ácidos graxos são moléculas hidrofóbicas, elas têm capacidade de serem excretadas por difusão através da membrana interna e externa (Lennen & Pfeleger, 2012), processo esse possivelmente facilitado por proteínas transportadoras em uma ou ambas as camadas membrânicas. O processo de super-produção de ácidos graxos tende a estimular a síntese de fosfolipídeos de membrana (Parsons & Rock, 2013; Cho & Cronan, 1995) e isso pode levar ao aumento da superfície celular. Além disso, sob super-expressão de tioesterase a taxa de produção de ácidos graxos pode ser maior que a capacidade máxima de excreção desses lipídeos, assim, podendo favorecer o acúmulo de membrana (Lennen *et al.*, 2011), o que pode ter levado ao aumento do tamanho das células (Fig. 27). A ativação ou inativação da biossíntese de ácidos graxos está relacionada a taxa de crescimento e ao tamanho celular. É conhecido que a deleção do gene *fabH* causa aumento da produção de C18 e redução de C16, assim como a redução da taxa de crescimento e do tamanho da célula (Yao *et al.*, 2012) enquanto que a super-expressão de *fabH* leva ao efeito oposto (Tsay *et al.*, 1992).

O conteúdo de FFA predominantemente associados a célula é diferente do conteúdo produzido sob super-expressão de tioesterase (BTE), sendo C16-18 predominantemente associado a membrana e C8-14 apresentando-se como ácido graxo excretado ou acumulado em vesículas lipídicas intracelulares (Lennen *et al.*, 2011). Neste trabalho foi apresentado resultado que indica que não só a estirpe que mais produziu FFA totais (g/g), mas também a que mais produziu C16:0 e C14:0 totais (g/g) foi a que apresentou maior aumento de tamanho (FT8000) relativo a mesma estirpe sem expressão de TesA (Fig 27A). Ademais, a estabilidade da membrana celular também está relacionada ao tempo necessário para a formação e arranjo da mesma (Parsons & Rock, 2013), assim, possivelmente a estirpe FT8000 possua maior viabilidade de membrana para suportar a super-produção de FFA, uma vez que possui mais baixa taxa de crescimento (Atkinson & Ninfa, 1998).

5.2.3 Quantificação de malonil-CoA *in vivo* resultante da co-super-expressão de ACC e GlnB em *E. coli* duplo-mutante *glnK/glnB*

Ainda há muito a ser elucidado sobre a regulação da enzima ACC multi-subunidade bacteriana. Contudo, sabe-se que esta enzima pode ser regulada pelo controle da expressão de suas subunidades, BCCP e BC (James & Cronan, 2004) (Fig. 17B) e pela, não totalmente aceita, regulação

da tradução da subunidade CT (Meades *et al.*, 2010) (Fig. 17C). A regulação de ACC mais bem aceita é a inibição alostérica da ACC por acil-ACPs (Davis & Cronan, 2001; Evans *et al.*, 2017) (Fig. 17A), no entanto, não se sabe muito a respeito dessa inibição. Além disso, há indícios de que os genes codificantes das subunidades da enzima ACC são transcritos de acordo com a taxa de crescimento de *E. coli* (Li & Cronan, 1993). Contudo, neste trabalho foi verificado equivalente quantidade de proteínas totais (g/g peso seco) e de BCCP nativa biotinilada entre as estirpes ET8000, PT8000 e FT8000 com e sem super-expressão de TesA por western blot com streptavidina-HRP (dados não mostrados).

O malonil-CoA é mantido sob baixas concentrações em *E. coli*, pois é somente consumido para a síntese de ácidos graxos, em que é necessário para as etapas de alongamento. A formação de malonil-CoA constitui a etapa limitante da síntese de ácidos graxos, logo, sua concentração tende a se manter baixa e constante, pois conforme é produzido é irreversivelmente consumido nesta via (Lennen & Pfleger, 2012). Sob super-expressão de ACC se observa aumento do malonil-CoA em até 3 vezes comparado ao nível encontrado em *E. coli* selvagem (0,07nmol/mg de peso seco) (Zha *et al.*, 2009). Entretanto, a super-expressão de ACC não aumenta a produção de ácidos graxos (Davis & Cronan, 2001; Lennen *et al.*, 2010), somente é verificado aumento da produção de conteúdo lipídico sob super-expressão de TesA, aumento o qual é otimizado com a co-super-expressão de ACC (Davis *et al.*, 2000). Outra forma de se aumentar os níveis de malonil-CoA conhecida é por meio do uso de um composto antibiótico, chamado cerulenina, que leva a inibição da síntese de ácidos graxos, assim, o uso desse composto em cultura leva a redução dos níveis de acil-ACP, inibidor alostérico da ACC. Por inibir a atividade das enzimas FabB e FabF, a cerulenina gera um drástico acúmulo de malonil-CoA sob super-expressão de ACC (Davis *et al.*, 2000). Neste trabalho, foram realizados alguns ensaios preliminares utilizando cerulenina, possibilitando a verificação de um significativo aumento de malonil-CoA em estirpe selvagem tratada com este composto em relação a não tratada, de forma dose-dependente (dados não mostrados), no entanto, o custo desse reagente torna seu uso bastante inviável (Zha *et al.*, 2009), não possibilitando prosseguimento com tal metodologia.

No presente trabalho, foi verificado que as proteínas PII são capazes de interagir com BCCP-BC formando um complexo ternário *in vitro* sob controle de MgATP e 2-OG. Ainda, foi apresentado experimento mostrando que GlnB inibe a atividade da ACC *in vitro*. Por conseguinte, experimentos de quantificação de ácidos graxos sugeriram que estirpes *E. coli* mutantes *glnB* e *glnK/glnB*, sob super-expressão de TesA, apresentam maior produção de ácidos graxos que a estirpe selvagem super-expressando TesA. Contudo, para se determinar o específico mecanismo que resulta no aumento dos níveis de ácidos graxos produzidos por mutante PII foram realizados experimentos para se quantificar os níveis de malonil-CoA de estirpe de *E. coli* duplo mutantes *glnK/glnB*. As células da estirpe FT8000 foram transformadas com pBAD33-ACC (Cm^r), para se aumentar o conteúdo de malonil-

CoA celular e favorecer a detecção por LC/MS. As mesmas células também foram transformadas com pDK5PII (Amp^r), para super-expressar GlnB e, assim, se analisar o quanto haveria de redução do aumento de malonil-CoA em caso de haver inibição da ACC por GlnB. Assim, após as células serem crescidas até DO₆₀₀ próxima de 0,5, os metabólitos foram extraídos e analisados em LC/MS. Como resultado, apresentado na figura 28, pode-se observar que as células FT8000 sob super-expressão de ACC apresentaram 2 vezes mais malonil-CoA que o relatado para *E. coli*

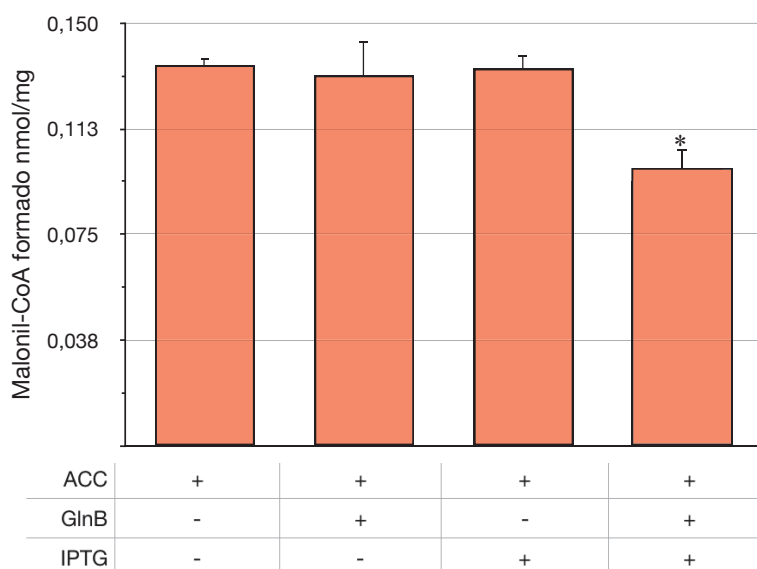


FIGURA 28- Produção celular de malonil-CoA na presença de GlnB. Em LC/MS foi realizada a quantificação de malonil-CoA de células FT8000 transformadas com pBAD33-ACC (Cm^r) ou com pBAD33-ACC (Expressa EcACC) mais pDK5PII (expressa AbGlnB) (Amp^r). As células foram submetidas a crescimento na presença de 0,2% de L-arabinose na ausência ou presença de 0,1mM de IPTG a partir de DO₆₀₀ teórica inicial de 0,05 (até ~0,5). Os metabólitos foram extraídos após adição de padrão interno ¹⁴C-malonil-CoA (Sigma), a partir do qual os picos integrados foram normalizados. Asterisco indica diferença estatisticamente significativa em relação as demais condições. Análise de variância ANOVA de duas vias e teste Turkey, p<0,05.

selvagem (Zha *et al.*, 2009), confirmando o esperado aumento desses níveis (Davis & Cronan, 2000), exceto quando sob co-super-expressão de GlnB, pois nesta condição se verifica redução do aumento dos níveis de malonil-CoA em ~30% em relação as demais condições sem super-expressão de GlnB. Esses dados sugerem que GlnB está interagindo com a ACC *in vivo* e está inibindo a atividade desta enzima, assim, reduzindo o aumento de malonil-CoA na célula gerado pela super-expressão de ACC.

No metabolismo central de *E. coli*, a fonte de carbono, preferencialmente a glucose, é consumida através de uma série de reações enzimáticas gerando piruvato. Subsequentemente, o piruvato é oxidativamente descarboxilado pelo complexo da piruvato desidrogenase produzindo CO₂ e acetil-CoA. Enquanto a maioria do acetil-CoA entra no ciclo de Krebs, uma pequena parcela é direcionada à biossíntese de ácidos graxos, em que o acetil-CoA é convertido a malonil-CoA pela acetil-CoA carboxilase (ACC). A ACC é uma enzima essencial, e a sua completa inibição resultaria

em inviabilidade celular (Waldrop & Cronan, 2002). Desta forma, a concentração de malonil-CoA na célula é bastante baixa e precisa ser finamente controlada, uma vez que este metabólito é direcionado à síntese de ácidos graxos de forma irreversível e coordenada com a síntese de fosfolipídeos, com o crescimento celular (Lennen & Pfeleger, 2012; Zha *et al.*, 2009) e também em coordenação com o metabolismo de carbono, nitrogênio e energia. Um metabólito intermediário do ciclo de Krebs e concomitantemente esqueleto carbônico da assimilação de nitrogênio é o 2-oxoglutarato (2-OG), molécula a qual é considerada regulador global do metabolismo (You *et al.*, 2013; Schumacher *et al.*, 2013; Huergo & Dixon, 2015).

As proteínas transdutoras de sinais da família PII são consideradas proteínas integradoras do metabolismo de carbono, nitrogênio e energia (Forchhammer, 2008; Baud *et al.*, 2010). No que diz respeito ao metabolismo de carbono, sugere-se que as proteínas PII sejam responsáveis pela fina regulação da síntese e da composição de ácidos graxos (Baud *et al.*, 2010), sugestão a qual é suportada pelos dados apresentados neste trabalho. Essa função de PII, de regulação da síntese de ácidos graxos pela inibição da enzima ACC, parece ocorrer de forma bastante conservada, uma vez que a interação PII-BCCP, assim como o efeito fenotípico de aumento de conteúdo lipídico em mutantes PII, são encontrados em bactéria (este trabalho; Rodrigues *et al.* 2014), em cianobactéria (Hauf *et al.*, 2016), alga (Zalutskaya *et al.*, 2015) e em planta (Baud *et al.*, 2010; Feria Bourrellier *et al.*, 2010). Além disso, a interação de PII com BCCP é relatada como sendo principalmente regulada pela concentração de 2-OG (este trabalho; Rodrigues *et al.* 2014; Hauf *et al.*, 2016; Feria Bourrellier *et al.*, 2010), sugerindo que PII é a proteína chave na transdução dos sinais dos níveis de 2-OG, em coordenação com os níveis de ATP/ADP e glutamina.

O aumento dos níveis de malonil-CoA causado pela super-expressão de ACC, foi reduzido em resposta a co-super-expressão de GlnB (Fig. 28), o que pode sugerir que o efeito da deleção de genes *glnB* ou *glnK/glnB* nos níveis de ácidos graxos (Fig. 30 e 26) ocorre devido a não inibição de ACC por GlnB. Os níveis de 2-OG em células selvagens (ET8000) sob condições suficientes de nitrogênio relatados são de baixo 2-OG (0,05mM) e em *glnK/glnB* (FT8000) foi observado um aumento para cerca de 0,4mM. Contudo, em células mutantes *glnB* (PT8000) os níveis são iguais aos selvagens (Reyes-Ramirez *et al.*, 2001). Com isso, se pode sugerir que o aumento observado, neste trabalho, dos níveis de ácidos graxos sob super-expressão de TesA nas células mutantes PII (PT8000 e FT8000) em relação a *E. coli* selvagem (ET8000) ocorre pela depleção de agente inibidor (proteínas PII) da enzima ACC, premissa suportada pela redução observada do aumento dos níveis de malonil-CoA pela co-super-expressão de GlnB e ACC em comparação com células super-expressando apenas ACC.

5.3 ESTUDOS ESTRUTURAIS

5.3.1 Purificação do complexo BCCP-PII

Com o intuito de se poder iniciar experimentos de cristalização para possivelmente resolver a estrutura cristalográfica do complexo GlnB-BCCP ou GlnB-BCCP-BC foram realizados ensaios de purificação em gel filtração. Para isso, analisando a preparação de BCCP em coluna de gel filtração verificou-se que sob as condições de purificação utilizadas, essa proteína forma agregados solúveis de alta massa molecular, eluindo prevalentemente no volume morto da coluna (Fig. 29A e B). Contudo, em gel filtração de uma outra preparação de BCCP em que se obteve uma menor concentração de proteína, verificou-se a formação de agregados de menor massa molecular nos volumes de eluição de 10,65mL e de 15mL, onde a massa molecular esperada de proteína correspondem a forma ~ hexamérica e a forma monomérica de BCCP, respectivamente, como se observa na figura 29A e C, indicando que a elevada concentração de BCCP pode favorecer a formação de agregados solúveis de alta massa molecular.

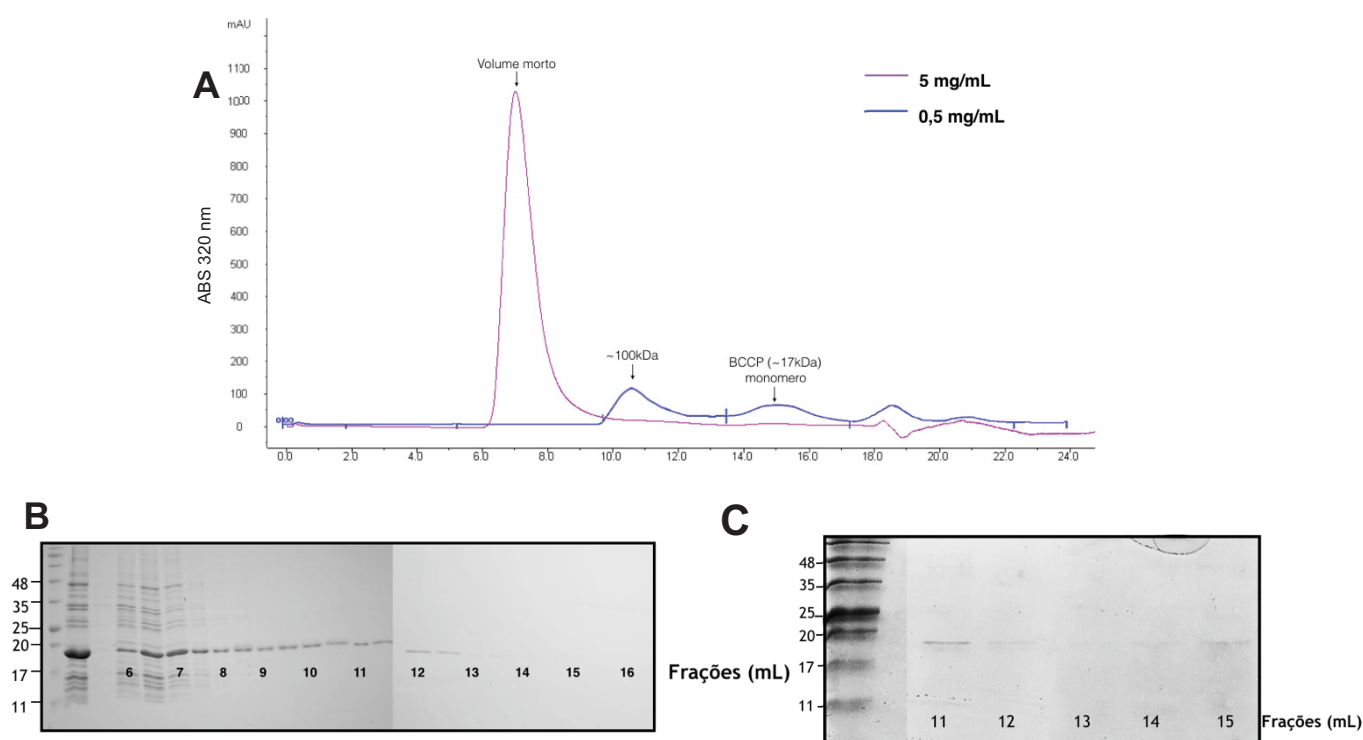


FIGURA 25. Perfil cromatográfico da holo-BCCP de *E. coli* em gel filtração. **A-** Cromatograma de BCCP em gel filtração, coluna superose 12 10/300 GL (GE Healthcare) (UV 280nm). Perfil cromatográfico em rosa proveniente de corrida de holo-BCCP purificada em uma concentração de 5mg/mL. Perfil cromatográfico em azul proveniente de corrida de holo-BCCP purificada a 0,5mg/mL. **B-** Frações da gel filtração representada no perfil cromatográfico em rosa (A) (5mg/mL). Na linha A foi aplicada a amostra aplicada na coluna. **C** – Frações da gel filtração representada no perfil cromatográfico em azul (A) (0,5mg/mL); SDS-PAGE 15% cada gel possui linhas numeradas conforme volume de eluição, nas quais 10µL foram aplicados de cada fração. Coloração Coomassie Blue.

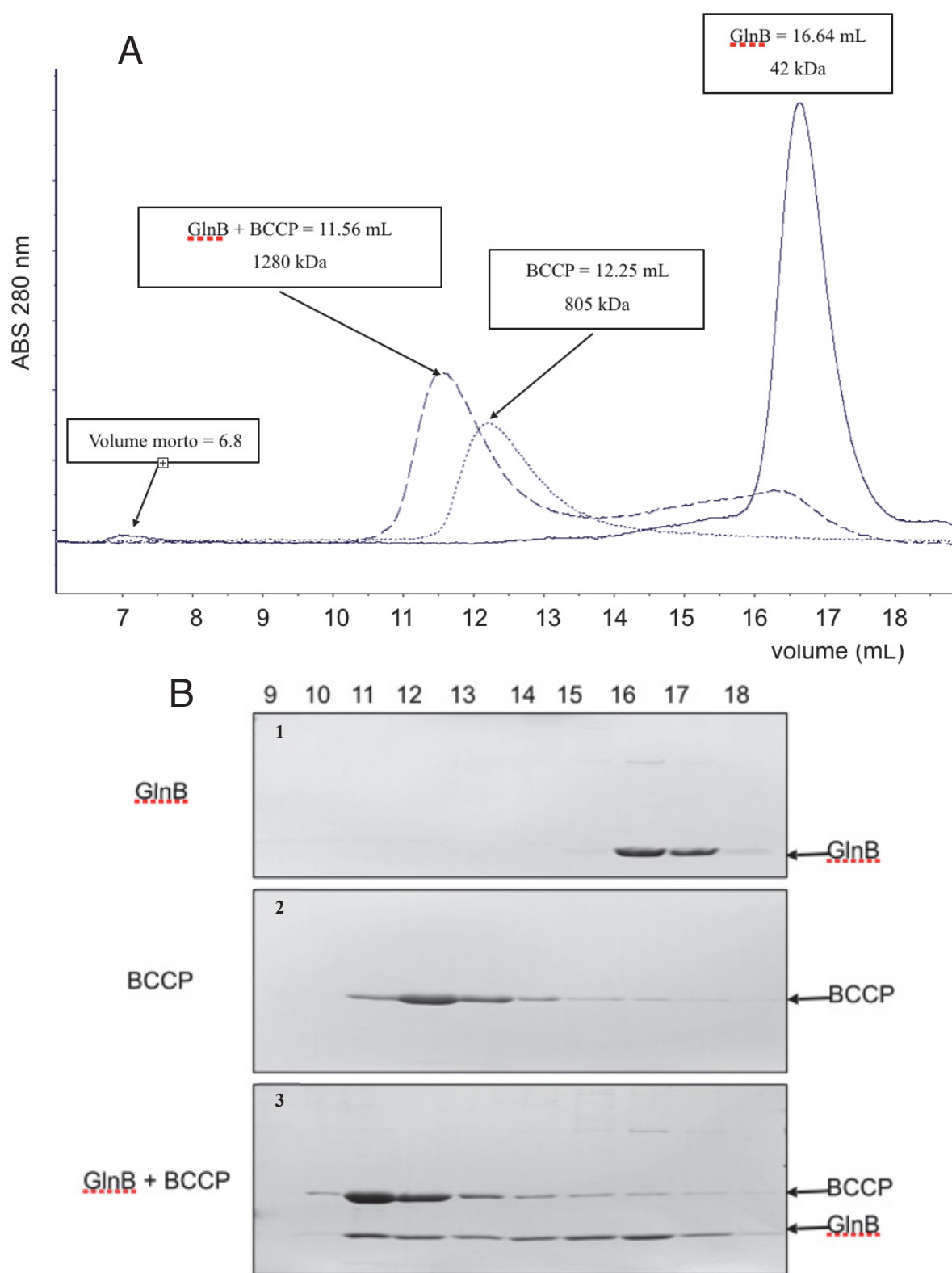


FIGURA 26. Formação do complexo BCCP-GlnB de *E. coli* em gel filtração. **A-** Perfil cromatográfico em gel filtração em tampão Tris-HCl pH 8 50 mM, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 5 mM e 1mM MgATP (coluna superose 6) de GlnB (gel B1), BCCP (gel B2) e do complexo GlnB-BCCP (gel B3) em gel filtração. **B-** SDS-PAGE com frações da gel filtração A; 1- Frações da gel filtração de GlnB. 2- Frações da gel filtração de BCCP. 3- Frações da gel filtração de GlnB e BCCP misturadas 1:1 (mg/mg); acrilamida 15%, Coomassie blue.

O estado de oligomerização de BCCP não é conhecido, se discute que, *in vivo*, BCCP poderia ser dimérica ou somente encontrada ligada à BC, uma vez que os genes de BC e BCCP são expressos a partir do mesmo operon *accBC* (Cronan & Waldrop, 2002). Proteínas que tendem a formar agregados podem obter maior estabilidade conformacional na presença de um ligante ou proteína de interação (Pastore & Tamussi, 2012), assim, desfavorecendo a agregação. Por isso, hipotetizou-se que BCCP possivelmente viesse a apresentar formas não agregadas na presença da proteína de interação BC e/ou GlnB em complexo BCCP-GlnB em todas as frações de eluição (Fig. 26 B3), indicando que o complexo ocorreu em gel filtração, pelo padrão de migração das bandas de GlnB e de BCCP. Isso mostra que PII interage com todas as formas agregadas de BCCP, inclusive com formas possivelmente não agregadas, no volume 14 e 15, onde se tem bastante baixa concentração do complexo GlnB-BCCP. Fica assim bastante claro o caráter não homogêneo dessa interação, sendo a homogeneidade um fator importante para iniciar ensaios de cristalização.

Seguindo a hipótese de que a adição de um ligante poderia conferir estabilidade a BCCP e assim obter formação de complexo estável e homogêneo, foi então acrescida a proteína BC a mistura GlnB/BCCP, experimento representado na figura 27, em que primeiramente a proteína BC foi submetida a gel filtração e, assim, foi verificada oligomerização conforme esperada, formação de BC homodimérica (Waldrop *et al.*, 1994) (Fig. 27A). Assim, uma vez conhecendo o comportamento das proteínas GlnB, BCCP (Figura 26) e BC (Fig. 27A) em gel filtração, as proteínas HisGlnB, BCCP e BC (para métodos ver item 3.7.2), foram separadamente expressas e tiveram, após processo de biotilação de BCCP, seus extratos proteicos incubados sob tampão com MgATP 3,5mM e, assim, foi possível purificar o complexo HisGlnB-BCCP-BC em larga escala (para métodos ver item 4.8.2) e então carregar a coluna de gel filtração com o eluato dessa co-purificação (Fig. 27B, gel iii, linha 1). A fração coletada no volume correspondente ao pico, 40,46mL, foi submetido a eletroforese, como mostra a figura 27B, gel iii, linha 3, na qual se verifica que foi obtido um padrão de bandas de intensidades próximas entre HisGlnB e BCCP e com uma mais fraca intensidade na banda correspondente à BC, o que poderia indicar que nem todo complexo HisGlnB-BCCP formado está ligado a BC (Fig. 27B, gel iii, linha 3).

Devido a BC ser uma proteína homodimérica (~100kDa) e possuir mais que o dobro em massa comparado a GlnB e ser mais de 5 vezes maior em massa que o monômero de BCCP, se esperaria uma banda mais intensa para BC, pois levando em conta que para uma estequiometria molar de 1:1 (Choi-Rhee & Cronan, 2003) ou 1:2 (Broussard *et al.*, 2013) entre BC:BCCP (monômeros) seria esperada uma proporção em massa de ~3:1 ou ~3:2 de BC:BCCP, respectivamente, e essas proporções seriam diretamente visualizadas nas intensidades das bandas em SDS-PAGE, o que não ocorreu neste experimento (Fig.27B).

Embora não se conheça a estequiometria do complexo GlnB-BCCP-BC é pertinente considerar que a proporção estequiométrica entre BC e BCCP complexadas deveria seguir o padrão demonstrado na literatura (Choi-Rhee & Cronan, 2003; Broussard *et al.*, 2013). Além disso, o pico observado a 40,46mL é correspondente ao volume morto da coluna utilizada, portanto, não se pode concluir homogeneidade do complexo nesse volume de eluição. Contudo, ainda assim foi realizado, sem sucesso, triagem com kits de cristalização disponíveis (PEG/Ion, INDEX; JGCS I e II, Wizard I, II e

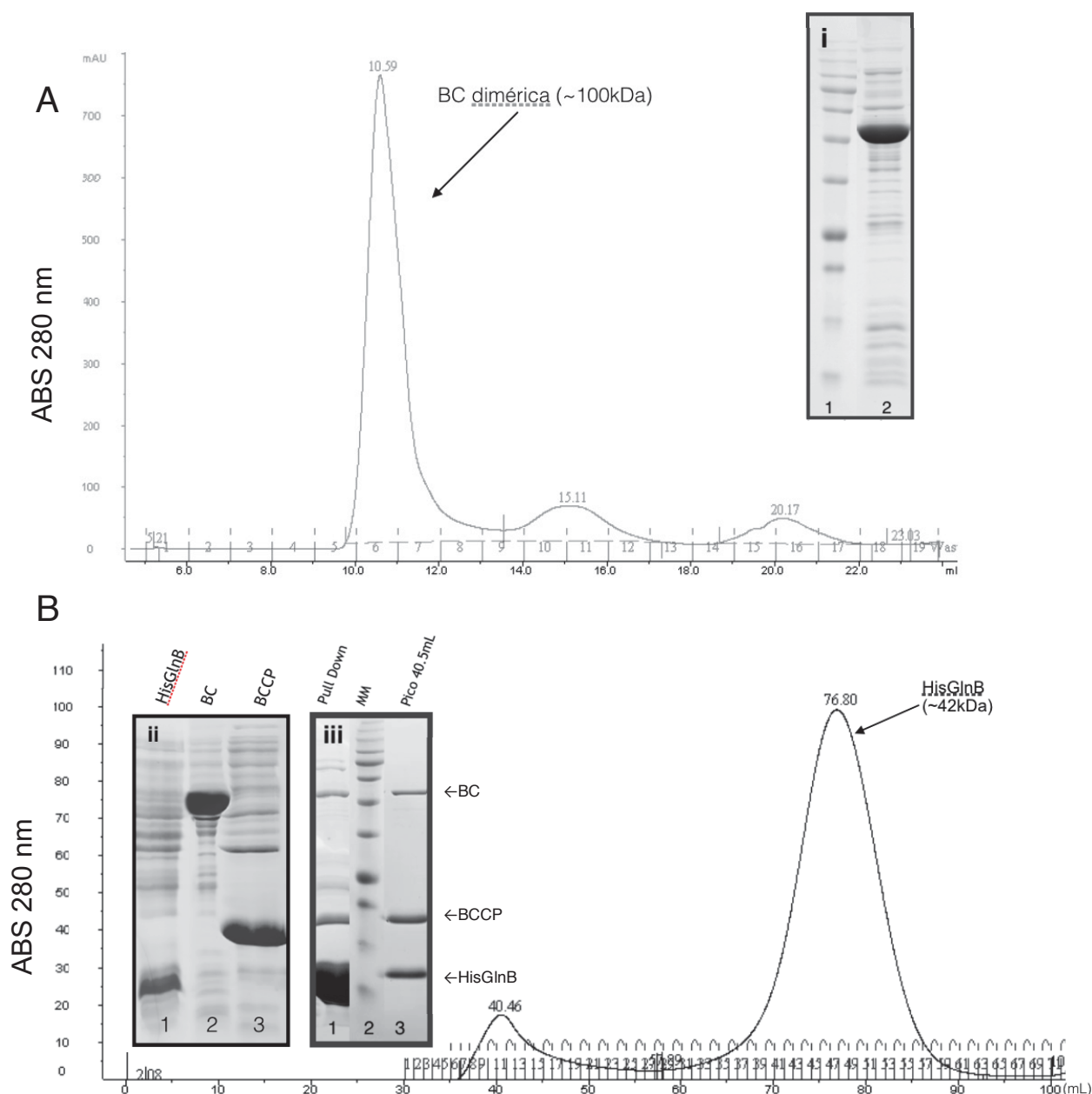


FIGURA 27. Formação do complexo BC-BCCP-GlnB de *E. coli* em gel filtração. A- Perfil cromatográfico da gel filtração de BC; **i1**- marcador de massa; **i2**- Fração central do pico de BC (11mL). B- Perfil cromatográfico da gel filtração do complexo HisGlnB-BCCP-BC co-purificado em beads de níquel. **ii1**- Extrato de His-GlnB (5µL). **ii2**- Extrato de BC (1µL). **iii3**- Extrato de holo-BCCP/BirA (5µL). **iii1**- Amostra co-purificada em beads de níquel que foi submetida à gel filtração B; **iii2**- marcador de massa; **iii3**- Fração central do pico do complexo (40.5mL). A- Coluna 10/300 Superose 12 GL (GE Healthcare); B - Coluna 16/60 Sephacryl S-300 HR (GE Healthcare). SDS-PAGE 15% Coomassie blue. Marcador de massa: 11, 17, 20, 25, 35, 48, 63, 75, 100, 135, 180, 245 kDa.

III e Crystal Screen Cryo), baseado no fato de ter sido obtida estrutura de BC-BCCP a partir de cristal formado com amostra de proteínas provinda de volume morto de coluna de gel filtração (Broussard *et al.*, 2013). Frações próximas ao volume de 40,46mL foram usadas para se tentar concentrar as amostras por centrifugação (Colunas Millipor - 30kDa, conforme indicação do fabricante), mas houve precipitação de proteínas no processo.

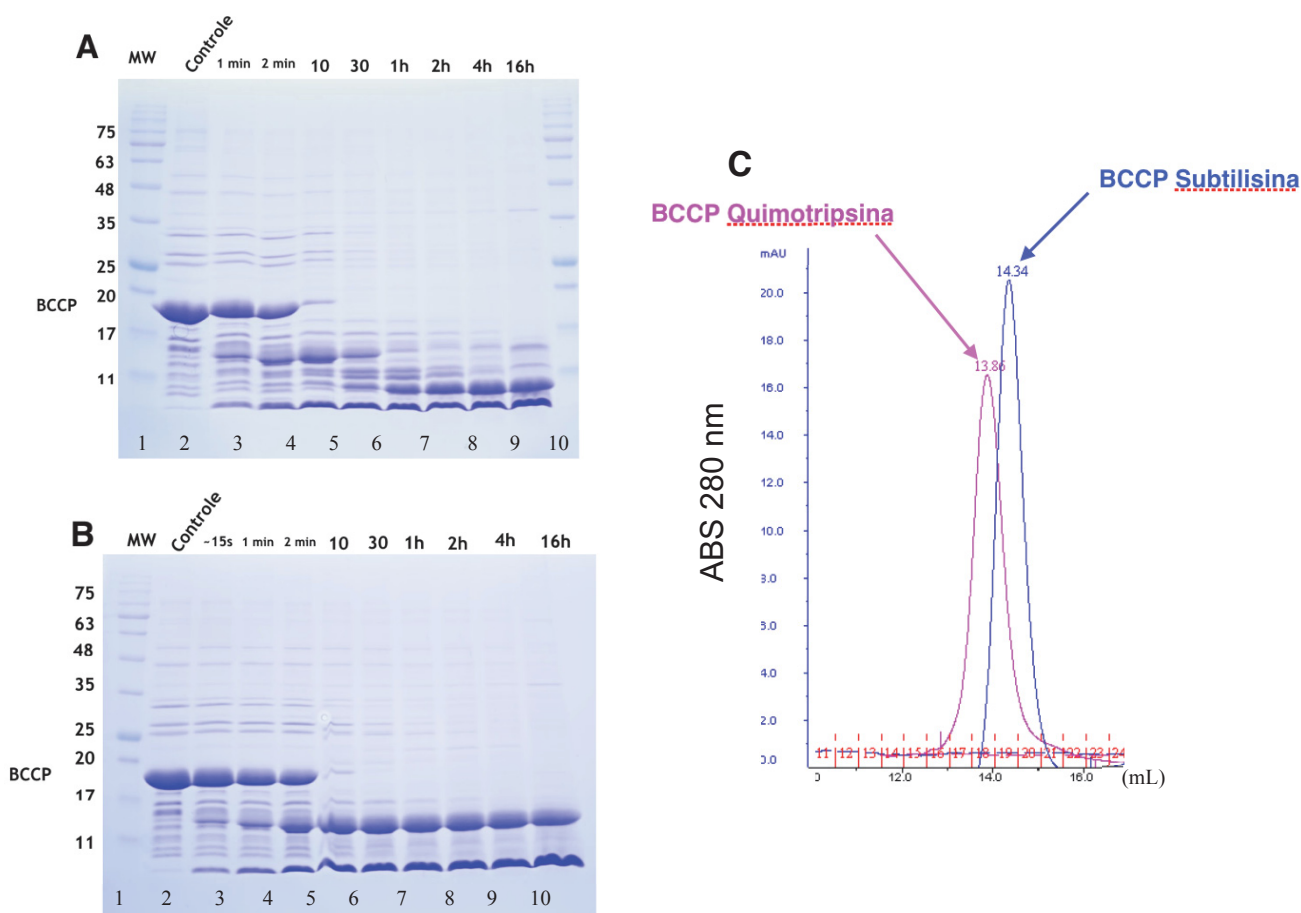


FIGURA 28. Proteólise limitada da BCCP de *E. coli*. **A-** Gel SDS-PAGE mostrando a proteólise limitada de BCCP por subtilisina. Linha A2 indica a proteína holo-BCCP não proteolisada; Linhas A3-A10 representam proteólise conforme o tempo de incubação com subtilisina, como indicado. **B-** Gel SDS-PAGE mostrando a proteólise limitada de BCCP por quimotripsina. Linha B2 indica a proteína holo-BCCP não proteolisada; Linhas A3-A10 representam proteólise conforme o tempo de incubação com quimotripsina, como indicado. **C-** Gel filtração de BCCP após proteólise de 16h com subtilisina (azul) sobreposto com quimotripsina (rosa). Coluna 10/300 Superose 12 GL (GE Healthcare); SDS-PAGE 15% Coomassie blue. Marcador de massa (A1, A11 e B1): 11, 17, 20, 25, 35, 48, 63, 75, 100, 135, 180, 245 kDa.

É sabido que a porção C-terminal de BCCP é proteoliticamente protegida contra subtilisina, deste modo, por meio de incubação de BCCP com esta enzima proteolítica, foi obtido o peptídeo da porção C-terminal de BCCP biotinilada, de forma não agregada, possibilitando a resolução de sua estrutura cristalográfica (Athappilly & Hendrickson, 1995). Sabendo disto, perante a dificuldade de se obter homogeneidade em preparações usando BCCP inteira, foi realizado experimento de proteólise limitada de holo-BCCP com as enzimas proteolíticas subtilisina ou quimotripsina (Fig. 32).

Após incubações de ~16h de BCCP com subtilisina ou quimotripsina houve um fragmento remanescente de massa menor que 11kDa (Fig. 32A, linha 10) e outro de ~14kDa (Fig. 32B, linha 11), respectivamente. Esses fragmentos foram submetidos a gel filtração (Fig. 32C) e verificou-se que se apresentaram de forma homogênea em um único pico, a 14,3mL para BCCP digerida com subtilisina (BCCP_{Sub}) e 13, 8mL com quimotripsina (BCCP_{Chy}). Consecutivamente, tais fragmentos de BCCP foram testados quanto a capacidade de interação com PII de *E. coli* em ensaios de *pull down* (Figura 33).

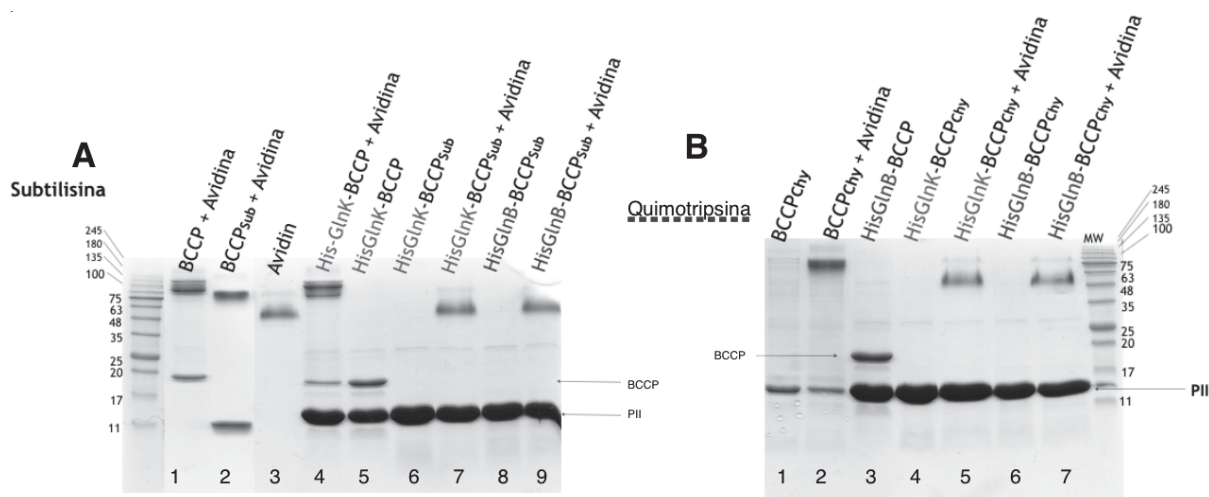


FIGURA 33. Ensaio de *pull down* entre BCCP digerida por proteólise limitada e proteínas PII de *E. coli*.

A- Linha 1: 5µg de BCCP não proteolisada foram aplicadas no gel acrescido de avidina (5µg - quantidade não saturante). Linha 2: ~5µg de BCCP_{Sub} foi aplicado no gel acrescido de avidina. Linha 3: Somente avidina (5µg) aplicada no gel. Linha 4: *Pull down* com HisGlnK (5µg) + BCCP (15µg) não proteolisada + avidina (5µg). Linha 5: *Pull down* com HisGlnK (5µg) + BCCP não proteolisada. Linha 6: *Pull down* com HisGlnK (5µg) + BCCP_{Sub} (20µg). Linha 7: *Pull down* com HisGlnK (5µg) + BCCP_{Sub} (20µg) + Avidina (5µg). Linha 8: *Pull down* com HisGlnB (5µg) + BCCP_{Sub} (20µg). Linha 9: *Pull down* com HisGlnB + BCCP_{Sub} (20µg) + avidina (5µg). **B-** Linha 1: foi aplicado 2,5µg de BCCP_{Chy}. Linha 2: mesma amostra aplicada na linha 1 acrescido de avidina (5µg - quantidade não saturante). Linha 3: *Pull down* com HisGlnB (5µg) + BCCP_{Chy} (15µg) não proteolisada. Linha 4: *Pull down* com HisGlnK (5µg) + BCCP (20µg). Linha 5: Mesma condição da linha 4, acrescido de avidina (5µg). Linha 6: *Pull down* com HisGlnB (5µg) + BCCP_{Chy} (20µg). Linha 7: Mesma condição da linha 6 acrescida de avidina (5µg). A avidina não fervida é adicionada no momento da aplicação no gel à amostra proveniente do ensaio de *pull down* preparada para SDS-PAGE previamente fervida (5 minutos a 100°C).

Na figura 33, se tem o resultado de ensaio de interação acoplado a ensaio de gel *shift* realizado entre as proteínas HisGlnK ou HisGlnB de *E. coli* contra BCCP_{Sub} (Fig. 33A) ou BCCP_{Chy} (Fig. 33B) acrescido de avidina como controle, pois, uma vez que há sobreposição de deslocamento eletroforético entre as proteínas PII e as formas digeridas de BCCP utilizadas no ensaio, a avidina foi adicionada (para métodos ver item 4.9.1) para possibilitar migração das BCCPs digeridas para a altura de banda correspondente a soma das massas moleculares da BCCP testada com a avidina. A avidina, por meio desse método de gel *shift* acoplado ao ensaio de *pull down*, pode se apresentar com banda correspondente a massa monomérica (55 kDa) somada a massa de BCCP não modificada (Fig. 33A,

linha 1 e 4), da BCCP_{Sub} (Fig. 33A, linha 2) ou BCCP_{Chy} (Fig. 33B, linha 2). Assim, foi testado se BCCP mantinha capacidade de interação com PII após digestão com as enzimas proteolíticas usadas e concluiu-se que, por meio desse método, não houve interação entre as proteínas, pois não se observou alteração alguma na migração da avidina quando foi adicionada às amostras submetidas a ensaio de interação entre HisGlnK e BCCP_{Sub} (Fig. 33A, linha 7), HisGlnB e BCCP_{Sub} (Fig. 33A, linha 9), HisGlnK e BCCP_{Chy} (Fig. 33B, linha 5) e HisGlnB e BCCP_{Chy} (Fig. 33B, linha 7), onde a avidina apresentou padrão de migração similar quando adicionada sozinha no gel (Fig. 33A, linha 3). Se houvesse interação entre PII e alguma forma digerida de BCCP, era esperado que a avidina migrasse como na figura 33A, linha 2, para BCCP_{Sub}, ou como na figura 33B, linha 2, para BCCP_{Chy}. Contudo, BCCP é uma proteína esperada para ser dimérica e/ou sempre ligada a BC *in vivo* (Waldrop & Cronan, 2002), deste modo, a interface de interação entre BCCP e PII talvez seja formada pela dimerização de BCCP e/ou requiera aminoácidos N-terminais de BCCP, o que poderia explicar porque PII não foi ábil a interagir com as formas digeridas de BCCP.

As proteínas PII, *EcGlnK* / *AbGlnZ* e *EcGlnB* / *AbGlnB*, mostraram ser capazes de interagir como BCCP *in vitro* de forma prevalentemente e negativamente controlada pelo efeito dose-dependente de 2-OG, ocorrendo somente na presença de MgATP, também de forma dose-dependente. Além disso, BCCP precisa estar biotinizada para haver interação com PII, e esta precisa estar desuridilada (Rodrigues *et al.*, 2014). Neste trabalho, foi mostrado que sob as mesmas condições de formação de complexo PII-BCCP, a proteína BC é capaz de formar complexo ternário PII e BCCP. Contudo, a concentração crítica de 2-OG observada que gera drástica desestabilização do complexo entre GlnK e BCCP é maior que 0,01 e menor ou igual a 0,05mM (Rodrigues *et al.* 2014), enquanto que a concentração de 2-OG necessária para causar drástica redução da interação entre GlnB, BCCP e BC é cerca de 10x maior ($0,1 < [2-OG] \leq 0,5\text{mM}$) (Figura 20). A concentração mensurada de 2-OG em *E. coli* ET8000 foi menor que 0,05mM sob condições de abundância de nitrogênio (NH₄) (Reyes-Ramirez *et al.*, 2001), esses dados de interação corroboram a formação do complexo ternário como sendo fisiologicamente relevante em condições de abundância de nitrogênio. Além disso, a provável ligação da subunidade CT ao complexo GlnB-BCCP-BC possivelmente torne o complexo quaternário ainda mais estável frente a uma maior faixa de flutuação nas concentrações intracelulares de 2-OG.

A formação de complexo ternário PII-BCCP-BC ocorreu tanto com HisGlnB como com HisGlnK (Fig. 19B e 23). No entanto, em ensaio inverso (Fig. 19A), utilizando HisBC como proteína-isca, não foi possível detectar GlnK ou GlnZ em interação com BCCP-BC. A formação do complexo ternário é dependente do *loop*-T de GlnB, uma vez que a deleção deste *loop* não permitiu interação com BCCP-BC, mas não somente o *loop*-T é importante para essa interação, pois GlnZ não passa a interagir com BCCP-BC possuindo mutações nos resíduos Q42H, S52D e S54D, mutações as quais propiciam que GlnZ possua *loop*-T muito semelhante ao de GlnB, em ensaio usando HisBC como

proteína-isca em ensaio de interação (Figura 22). Contudo, em ensaio de interação usando HisGlnK como proteína-isca foi detectada interação com BCCP-BC, assim como com HisGlnB. Esses dados levam a hipotetizar que ambas as proteínas PII, GlnB e GlnK, interagem com BCCP-BC, no entanto, o fazem de formas diferentes, ou seja, há aminoácidos de GlnB e GlnK diferencialmente envolvidos na interação. Visto que em ensaio de atividade a GlnK não exerceu efeito inibitório em ACC, e sim GlnB (Figura 24), podemos concluir que GlnB é a proteína fisiologicamente inibitória de ACC. Além disso, a interação de GlnK com BCCP-BC talvez não ocorra *in vivo* em *E. coli* devido ao fato de que as concentrações de 2-OG são baixas quando sob condições abundantes de nitrogênio (Schumacher *et al.*, 2013; Reyes-Ramirez *et al.*, 2001), condição na qual a GlnK não é expressa. Contudo, não se refuta um papel fisiológico de GlnK na regulação de ACC *in vivo*, pois mais estudos se fazem necessários para o melhor entendimento desse processo.

Baseado nos resultados de gel filtração (Figura 29, 30 e 31), GlnB aparentemente interage com BCCP sob todas as formas de agregação desta proteína, pois foi observada migração de GlnB para todos os volumes de eluição onde havia BCCP. Contudo, considerando que a concentração de BCCP possa ser um fator crítico para a determinação do estado de agregação de BCCP e que essa característica poderia ao menos ser parcialmente revertida diminuindo a concentração dessa proteína em solução, como pode indicar o resultado da figura 29, pode-se também considerar que PII interaja mais fracamente com BCCP em sua forma agregada. Isso se explicaria devido as características dos métodos utilizados. Nos ensaios de *pull down* padrão em menor escala utilizando proteína PII com cauda His (Figuras 19, 20 e 23), as proteínas testadas foram incubadas a uma concentração de 0,01 µg/µL de PII, 0,02 µg/µL de BCCP e 0,03 µg/µL de BC. Sob tais concentrações em que as proteínas são incubadas possivelmente haja favorecimento da interação, pois a BCCP sofreria reversão parcial de seu estado agregado, tornando-se, por isso, apta para interagir de forma mais estável com seus parceiros de interação, por estar mais diluída. Nesta mesma linha hipotética, por sua vez, no ensaio de gel filtração as proteínas tendem a ficar mais concentradas, pois este método agrupa moléculas de acordo com o peso molecular e isso levaria ao desfavorecimento de ligação de BCCP com seus parceiros de interação, uma vez que BCCP tenderia a formar agregados entre si conforme aumento de sua concentração. No ensaio de purificação do complexo GlnB-BCCP-BC (Figura 31) na etapa de co-precipitação das proteínas, antes de proceder a gel filtração, foram incubadas cerca de ~0,2 mg/mL de HisGlnB, com cerca de ~0,3 mg/mL de BCCP e ~0,4 mg/mL de BC, baseado nos volumes de extrato de proteínas utilizados e na densidade das bandas no gel (gel ii, fig. 31) em relação a concentração de proteínas totais. Essa é uma condição experimental que submete BCCP a uma concentração 15x maior do que no ensaio em pequena escala, assim, comparando o resultado do ensaio de *pull down* do complexo HisGlnB-BCCP-BC em pequena escala (Fig. 19B, linha 2) e larga escala (Fig. 31, gel iii, linha 1) nota-se, neste último, a menor proporção de BCCP co-precipitada com

HisGlnB, possivelmente devido a maior concentração de BCCP usada no ensaio. Na figura 30, gel 3, fica claro que a proporção de GlnB:BCCP diminui consideravelmente conforme se tem aumento da agregação de BCCP e, possivelmente, a estequiometria mais próxima da correta entre GlnB e BCCP encontra-se na linha 14 do gel 3 na figura 30.

Assim sendo, para obtenção de complexo estável entre GlnB e BCCP-BC a abordagem mutagênica seria uma alternativa para se poder obter uma BCCP mutada sem mudar drasticamente suas propriedades bioquímicas, de tal forma que BCCP não forme agregados e ainda interaja com PII de forma estável, e assim, possibilitando ensaios de cristalização. Dentro dessa estratégia, foram construídos alguns *primers* para a construção de formas de BCCP com pequenas deleções em sua porção N-terminal. As construções visaram a obtenção de BCCP em seus 87, 96, 105, 113, 127, 139, e 147 C-terminais. No entanto, aparentemente, a maioria das construções apresentaram efeitos tóxicos para a célula, sendo apenas as formas com 87, 105 e 113 aminoácidos C-terminais clonadas com sucesso. Porém, não foi possível biotinar essas construções por meio do método usado neste trabalho (item 4.9).

Em análise bioinformática de predição de parâmetros baseados em sequencia através do algoritmo XtalPred-RF (Jahandideh *et al.*, 2014) (tabela 2), BCCP foi qualificada dentro da classe das proteínas com a mais baixa probabilidade de cristalização (entenda-se “probabilidade de cristalização” referente tanto a formação de cristal quanto a qualidade de difração de possível cristal, passível de resolução de estrutura - Jahandideh *et al.*, 2014). A BCCP de *E. coli* foi situada na classe 11, em uma escala de decrescente de probabilidade de cristalização que vai de 1 a 11. Como mostrado na tabela 2, os parâmetros calculados baseados na sequencia de BCCP encontram-se quase todos fora da faixa dos valores ótimos, baseados no PSI (*Protein Structure Initiative*), banco de dados que deposita proteínas cristalizadas com sucesso e também proteínas que não cristalizaram, que falharam em processo de cristalização (Jahandideh *et al.*, 2014). Dentre estes parâmetros, destaca-se o comprimento de região predita como sendo desordenada em BCCP, com 53 aminoácidos de comprimento, correspondendo a mais de 1/3 do comprimento total da proteína (Fig. complementar 3). Além disso, também merece destaque o índice de hidrofobicidade de superfície de BCCP (determinado pelo número de aminoácidos hidrofóbicos preditos expostos na superfície), sendo comparável a índices de proteínas de membrana (PDB). Estas características provavelmente são determinantes para a formação de agregados solúveis de BCCP *in vitro*.

Os dados da tabela 2 sugerem que a obtenção da estrutura cristalográfica da BCCP em seu comprimento total é improvável, que BCCP não é uma proteína cristalizável. Assim, a obtenção da estrutura de BCCP complexada a GlnB e BC é uma tarefa bastante desafiadora, visto a dificuldade de se obter BCCP sob condições favoráveis de cristalização (não-agregada, homogênea e concentrada).

Tabela 2: Parâmetros analisados para cálculo de probabilidade de cristalização de BCCP.

Parâmetro	BCCP	Score ótimo
Comprimento total (AA)	156	<300
Ponto isoelétrico	4,66	5-6
Índice de <i>Gravy</i> *	0,01	-0,2 a -0,4
Comprimento de região desordenada	53	<10
Índice de instabilidade	67,75	<40
Porcentagem de estrutura em espiral	61	<40
Estrutura <i>Coiled-coil</i>	0	<20
Índice de inserção*	0,1	<0,2
Entropia de superfície	-1,06	<-1,1
Hidrofobicidade de superfície	-0,79	>-1,3
Complexidade de superfície	1,17	<1

Valores de *score* ótimo determinados por Jahandideh *et al.*, (2014) (XtalPred-RF). * indica o índice de hidropatia por número de aminoácidos. • indica o índice do número de *gaps* inseridos em alinhamento múltiplo

5.3.2- Cristalização da enzima GlnD de *E. coli*

As proteínas PII são proteínas envolvidas em uma gama funcional ampla e ainda não totalmente conhecida de processos regulatórios (Gerhardt, 2015). A atuação de PII se dá por meio da interação com proteínas alvo, transduzindo os sinais dos níveis de 2-OG, ATP/ADP e glutamina. Os metabólitos 2-OG, ATP e ADP são reguladores alostéricos das proteínas PII, estes, de acordo com a concentração em que se encontram na célula, se ligam diretamente em seus respectivos sítios ativos desencadeando mudanças conformacionais em PII, as quais determinam a afinidade dessas proteínas com determinadas proteínas alvo. Outro processo de modificação conformacional das proteínas PII ocorre por meio da ligação de grupamento UMP de forma covalente no resíduo de tirosina 51 no *loop-T* de cada homotrímero de PII em *E. coli*. Essa modificação, de adição de UMP (uridililação), ocorre pela atividade UTase da enzima GlnD, que é capaz também de remover esse grupamento UMP (atividade UR). A uridililação/desuridililação de PII ocorre de acordo com a concentração intracelular de glutamina, que, quando sob alta concentração, se liga em GlnD e favorece a atividade UR desta enzima. Por sua vez, quando sob baixa concentração de glutamina, GlnD tem sua atividade UTase favorecida. (Engleman & Francis, 1978; Jiang, Peliska & Ninfa, 1998; Xu *et al.*, 1998; Truan *et al.*, 2010; Rajandran *et al.*, 2011; Jiang & Ninfa, 1998; Jiang & Ninfa, 2007; Fokina *et al.*, 2010; Palanca *et al.*, 2017).

O estado de uridililação de PII regula a interação dessas proteínas com seus alvos. Deste modo, afim de se conhecer melhor o funcionamento da enzima GlnD no seu papel de percepção dos níveis de glutamina na célula e regulação das proteínas PII, foram realizados experimentos visando-se cristalizar GlnD para possibilitar resolução da estrutura desta enzima por cristalografia de raio-X.

Para se iniciar experimentos de cristalização se faz necessária a purificação de proteína com alto grau de pureza e concentração, assim como, o correto e estável arranjo conformacional da proteína purificada (Holcomb *et al.*, 2017). A expressão de GlnD de *E. coli* sem cauda de afinidade foi realizada a partir do plasmídeo pDOP1, sob controle de promotor P_L , em células BL21star cultivadas a 37°C, 200rpm em LB com indução pelo aumento da temperatura de cultivo para 42°C por 3 horas. Por meio dessa metodologia, GlnD foi super-expressa em uma quantidade percentual de

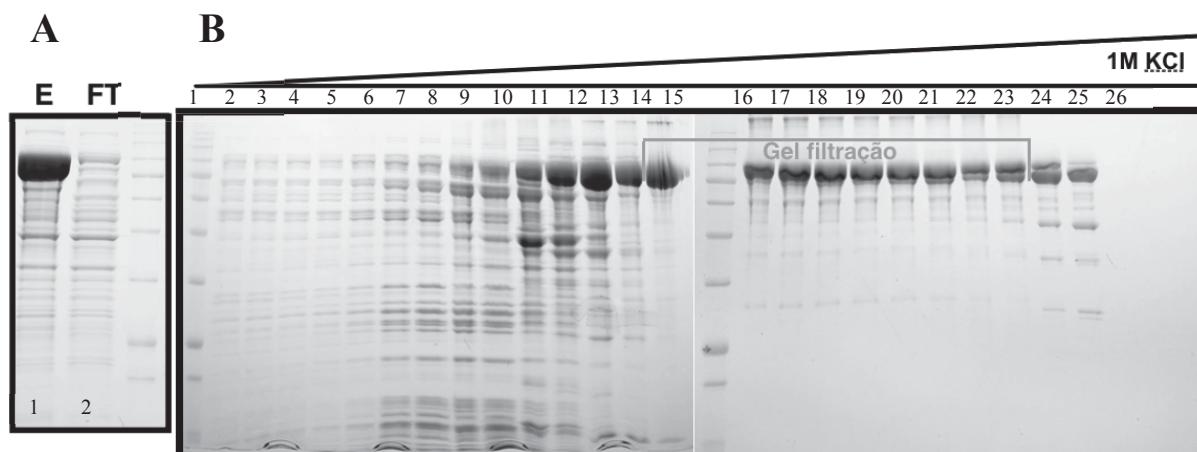


FIGURA 34. **Primeira etapa de purificação da GlnD de *E. coli*.** Coluna de heparina 5 mL em UPC10. **A-** E: Extrato de GlnD; FT- não ligado; **B-** Frações (2-26) eluídas com concentração crescente de KCl. Frações de 15-24 foram misturadas para aplicação em coluna de gel filtração. A3, B1 e B16: marcador de massa 11, 17, 20, 25, 35, 48, 63, 75, 100, 135, 180, 245 kDa. SDS-PAGE 10%, Coomassie blue.

proteínas totais bastante alta (Fig. 34A, linha 1). Após preparo de extrato de proteínas totais de células provenientes de 800mL de cultivo celular, esse extrato foi submetido à coluna HiTrap Heparin HP 5mL em sistema AKTA em tampão A (Tris-HCl 50mM pH 7.5, KCl 100mM, DTT 1mM, glicerol 10%). A eluição foi realizada em gradiente linear de KCl (100mM-1M) com tampão B (Tris-HCl 50mM pH 7.5, KCl 1M, DTT 1mM, glicerol 10%) (Fig. 34, gel B). Como resultado, se observa uma retenção quase total de GlnD na coluna utilizada, comparando-se o extrato (Fig34, gel A, linha 1) com o não-ligado (Fig34, gel A, linha 2). As frações mais puras foram misturadas (Fig. 34, gel B, linhas 15-24) para realização de purificação em gel filtração. Uma característica observada foi a ocorrência de precipitação de proteínas durante a preparação das amostras para SDS-PAGE, após a adição de tampão de amostra (concentrações finais: Tris-HCl 62.5mM pH6.8, SDS 2.5%, β -mercaptoetanol 5%, azul de bromofemol 0,002%, glicerol 10%), assim, a aplicação das amostras no gel se tornou uma tarefa dificultosa e essa característica resultou em determinados artefatos verificados no gel, dificultando algumas vezes a interpretação dos resultados. Por isso, a presença de bandas duplas e bandas de alta massa foram cautelosamente consideradas artefatos, levando em consideração demais análises consecutivas.

Em ensaio de gel filtração, as proteínas purificadas em coluna de heparina (Fig. 34) foram submetidas à coluna Coluna 16/60 Sephacryl S-300 HR equilibrada com tampão contendo Tris-HCl 20mM, KCl 200mM, DTT 1mM, resultando em perfil cromatográfico com formação de dois picos (Fig. 35A), os quais correspondem a GlnD em estado de agregado solúvel, no volume morto da coluna (pico 1) e à GlnD dimérica (200 kDa) (pico 2). Consecutivamente, as frações do pico 2 (Fig. 35A) foram misturadas e re-aplicadas na coluna, gerando como resultado o perfil cromatográfico da figura 35B, em que se observa um pico único e relativamente simétrico, em volume correspondente a cerca de 200 kDa. No entanto, ainda assim se pode verificar formação de agregação de proteína, visto que uma pequena banda referente à GlnD se apresentou no volume morto da coluna (Fig. 35B, gel ii, linha 2), significando que, sob tais condições de purificação, GlnD apresenta tendência a formar uma população de proteínas em estado agregado, sugerindo, portanto, instabilidade de GlnD nessas condições, o que possivelmente desfavoreceria a formação de cristais.

Visando-se obter uma preparação de GlnD propriamente purificada, em que esta proteína se apresenta de forma mais estável, foi adicionado 1mM de glutamina pois sabe-se que a glutamina é um ligante regulador da atividade desta enzima (Engleman & Francis, 1978; Jiang, Peliska & Ninfa, 1998) e sua presença poderia conferir maior estabilidade conformacional à GlnD. A glutamina foi adicionada desde o início do processo de purificação, a partir do tampão de lise. O extrato de proteínas foi preparado utilizando-se de 3L de cultivo celular para aumento da concentração das frações a serem obtidas na gel filtração. Além disso, a primeira etapa de purificação foi modificada com o objetivo de otimizar o tempo de preparo da amostra e, assim, possibilitar a realização de experimentos de cristalização no mesmo dia da purificação de GlnD, para se trabalhar com a preparação mais fresca possível. Deste modo, a purificação em coluna de heparina passou a ser realizada manualmente, com auxílio de uma seringa, ao invés da automação AKTA, em duas colunas de heparina de 5mL acopladas. Assim, a eluição foi realizada em duas etapas, uma etapa de lavagem (com 20% de tampão B) após carregamento da coluna de heparina com extrato de proteínas, e outra de eluição (com 50% de tampão B). Todo o volume eluído com 50% de tampão B foi adicionado à coluna de gel filtração S300 16/60 Sephacryl S-300 HR equilibrada com mesmo tampão do ensaio anterior (foi mantido em todo o processo 1mM de glutamina). Desta forma, foi observado como resultado uma drástica redução do conteúdo de proteína agregada, resultando um aumento do pico correspondente à GlnD dimérica (58,94mL) na gel filtração, como mostra a figura 35C. Por meio deste protocolo de purificação, foi possível obter GlnD sob alta pureza (>95%) pelo padrão de bandas, com razão 260/280nm de UV = 0,6 e concentração de 8,44 mg/mL obtida diretamente da fração central do pico (59mL) (Fig. 35C, gel iii, linha 2), a qual foi utilizada para ensaios de cristalização e que apresentou atividade de uridililação (Fig. 36) condizente com o esperado (Zhang *et al.*, 2010).

No mesmo dia do preparo da amostra, a fração coletada no volume de eluição de 59mL foi submetida a triagem de cristais, na concentração obtida em gel filtração (8,44 mg/mL), utilizando kits disponíveis no laboratório (PEG/Ion, INDEX; JGCS I e II, Wizard I, II e III e Crystal Screen Cryo). No dia seguinte à purificação de GlnD na presença de glutamina, mantendo as frações obtidas no gelo, foram realizados experimentos de cristalização com auxílio de robô nanopiteptador variando concentração de proteína e adicionando glutamina e/ou MnCl_2 às composições das soluções de precipitação fornecidos pelos kits PEG/Ion e INDEX para concentração final de 4mM e 0,2mM, respectivamente. As proteínas foram concentradas por centrifugação (coluna Millipore 30kDa) até 20mg/mL e foram então submetidas as soluções de precipitação providas pelos dois kits citados a 20, 10 e 4 mg/mL.

Assim, foram encontradas duas condições de cristalização de GlnD. A primeira se deu após 2 semanas a 20°C, em que se observou um pequeno cristal único hexagonal em BisTrisPH6.5 0.1M, PEG monometil eter 5000 (INDEX 46) com GlnD a 10mg/mL na presença de glutamina e MnCl_2 na solução de precipitação, a 4 e 0,2 mM, respectivamente. No entanto, além de esse cristal ter apresentado capacidade de difração extremamente reduzida (dados não mostrados), não foi possível reproduzi-lo. Por sua vez, na 4ª semana após submetimento de GlnD purificada a incubação a 20°C com as soluções comerciais de precipitação, foi encontrado um cristal único (cristal 2) na condição PEG/Ion 47 (citrato de potássio tribásico monohidratado 200mM, PEG 3350 20%) (Fig. 37A). Apesar do tamanho reduzido, sua capacidade de difração foi de 3.5Å em sincrotron (Fig.37).

Esse cristal (cristal 2) foi passível de reprodução apenas por meio de preparação fresca de proteína, em 5mM de glutamina ao invés de 1mM, (preparação a qual se mostrou reprodutível), sem processo de congelamento, por meio de método manual de pipetagem (1µL:1µL). Análise em SDS-PAGE confirmaram cristais de GlnD com banda conforme esperada (dado não mostrado). Porém, todos os cristais obtidos apresentaram tendência a formação de policristais (Fig. 37A), gerando *spots* sobrepostos de difração (Fig. 37B). Para melhoramento desses cristais quanto sua qualidade de difração, foram realizados experimentos explorando as redondezas das concentrações de PEG 3533 (10, 15, 20, 25%) e de proteína (2, 8, 10, 15 mg/mL). Assim, foram obtidos cristais maiores a 25% de PEG3533 e mais numerosos a 20%, tanto a 8 quanto a 10mg/mL de GlnD, únicas condições em que se obteve cristais, sem aumento aparente em resolução em sistema Rigaku, em relação ao cristal 2.

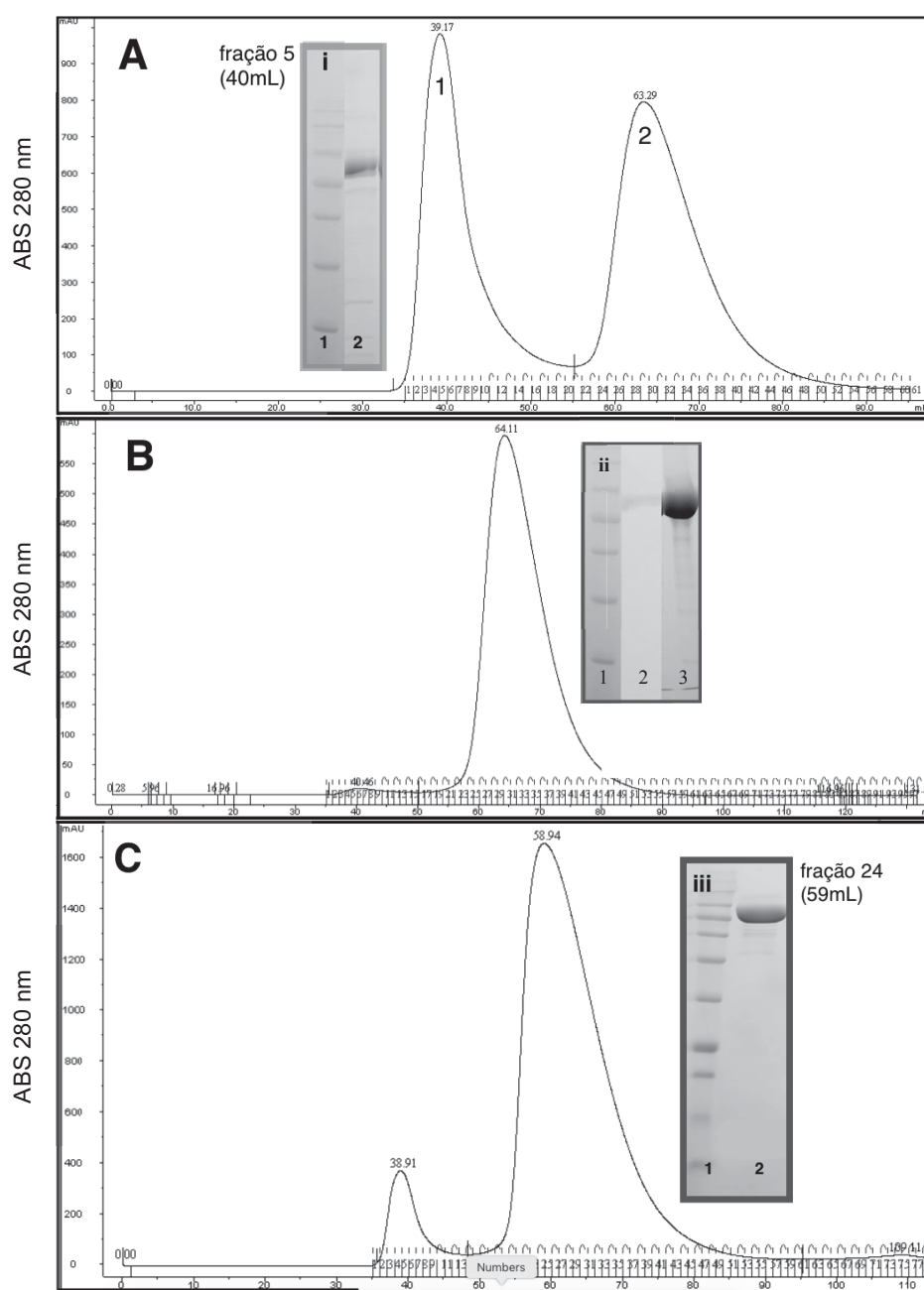


FIGURA 35. Perfil cromatográfico da enzima GlnD. **A-** Perfil de GlnD em gel filtração na ausência de glutamina; **i2-** fração central do pico 1 em SDS-PAGE. **B-** Perfil de gel filtração (sem glutamina) das frações de GlnD coletadas do pico 2 da gel filtração A; **ii2-** Fração coletada a 40mL. **iii2-** Fração central do pico. **C-** Perfil cromatográfico da enzima GlnD em gel filtração na presença de 5mM de glutamina; **iii2-** fração central do pico a 59mL. **i1, ii1, iii1-** Marcador de massa: 11, 17, 20, 25, 35, 48, 63, 75, 100, 135, 180, 245 kDa. Foram aplicados 5 µL (géis i e ii) e 2 µL (gel iii) nos géis. Coluna 16/60 Sephacryl S-300 HR (GE Healthcare).

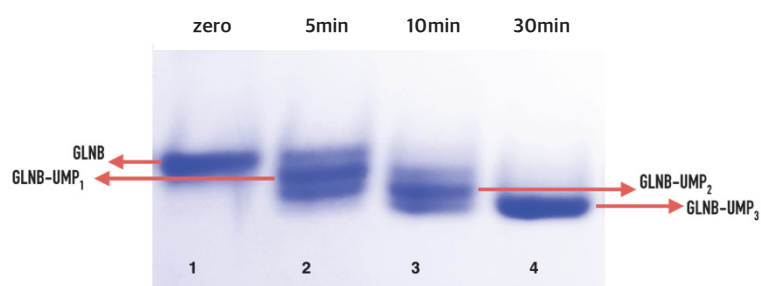


FIGURA 36. Gel de eletroforese Native-PAGE com amostras de GlnB uridilada por GlnD. 1- reação sem UTP; 2- reação após 5min. da adição de UTP; 3- reação após 10min. da adição de UTP; 4- reação após 30min. da adição de UTP. Tampão Tris-HCl pH7.5 100mM, KCl 100mM, $MgCl_2$ 2.5mM, DTT 1mM, BSA 0.3 mg/mL, ATP 1mM, 2-OG 10mM, UTP 50mM, GlnB 60 μ M e GlnD 0.1 μ M.

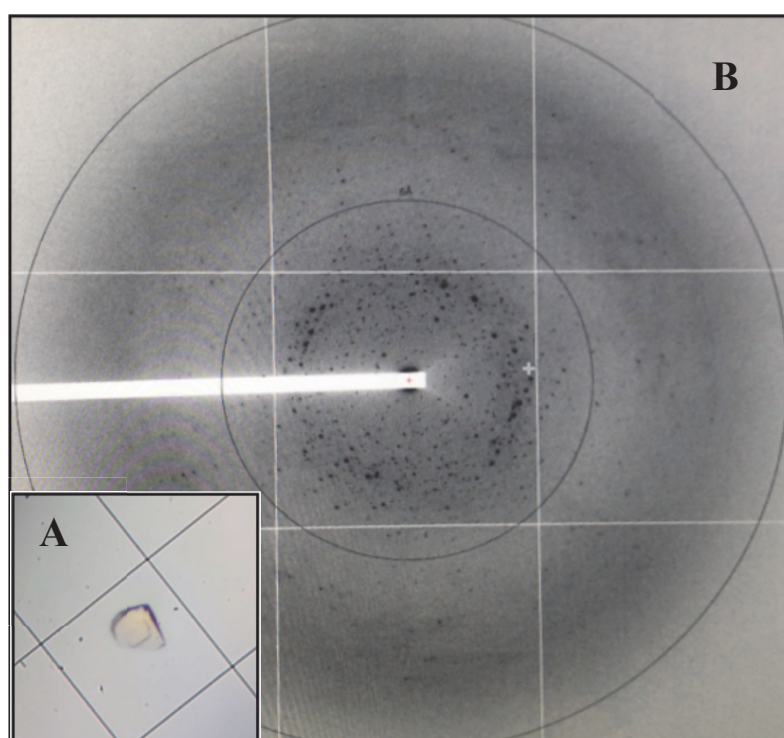


FIGURA 37. A- Cristal de GlnD (escala: lados do quadrado = 160 μ m). **B-** Padrão de difração do cristal A no síncrotron APS – Chicago-EUA.

Tabela 3- Dados do cristal. Dados coletados no sincrotron APS Chiacago-US.

	<i>Escherichia coli</i> GlnD
Fonte de raio-X	APS-NE-CAT ID-E
Grupo espacial	C2
Dimensões de célula a, b, c (Å) α , β , γ (°)	161.6, 146.0, 103.4 90.0, 104.0, 90.0
Resolução	50-3.5 (3.63-3.50)
Total de reflexões únicas	29,189
R _{merge} (%)	7.5 (92.6)
I/ σ I	15.5 (1.1)
Redundância	3.1 (3.1)
Compleitude	99.1 (99.9)

Uma análise *in silico* (XtalPred-RF) baseada na sequencia de GlnD foi realizada para avaliação da capacidade de cristalização desta enzima (tabela 3). Assim, a GlnD foi qualificada como classe 5 em probabilidade de cristalização, em uma escala decrescente de 1 a 11 (XtalPred-RF) (Tabela 3).

Tabela 4: Parâmetros analisados para cálculo de probabilidade de cristalização de GlnD.

Parâmetro	GlnD	Score ótimo
Comprimento total (AA)	890	<300
Ponto isoelétrico	6,25	5-6
Índice de <i>Gravy</i> *	-0,29	-0,2 a -0,4
Comprimento de região desordenada	26	<10
Índice de instabilidade	49,16	<40
Porcentagem de estrutura em espiral	36	<40
Estrutura <i>Coiled-coil</i>	0	<20
Índice de inserção*	0,07	<0,2
Entropia de superfície	-1,2	<-1,1
Hidrofobicidade de superfície	-1,28	>-1,3
Complexidade de superfície	1,52	<1

Valores de *score* ótimo determinados por Jahandideh *et al.*, (2014) (XtalPred-RF). * indica o índice de hidropatia por número de aminoácidos. • indica o índice do número de *gaps* inseridos em alinhamento múltiplo

Proteínas homólogas com estruturas conhecidas (algoritmo de busca: HMMER) com maior percentual de identidade são a polimerase-polyA de *Aquifex aeolicus* (PDB ID 3wfo), com 19% de identidade e 31% de cobertura, e uma proteína HD hidrolase, da família de proteínas HD (PDB ID

2pq7), com 26% de identidade, porém, com 8% de cobertura, deste modo, a execução de método de substituição molecular para resolução da estrutura seria inviável, por isso, se faz necessária a produção dos cristais de GlnD com inserção de L-selenometionina (Se-Met) ou a utilização de metais pesados para a determinação das fases. Esforços ainda devem ser investidos em ensaios de otimização desses cristais, além disso, uma abordagem mutagênica de GlnD poderia contribuir para o melhor entendimento da estrutura de GlnD e de seus domínios e como se relacionam em resposta a presença de seus ligantes, glutamina, $MgCl_2$ e $MnCl_2$, possivelmente induzindo a proteína a adotar uma conformação menos flexível, assim, favorecendo a cristalização.

A determinação da estrutura de GlnD de *E. coli* seria de importante contribuição para o melhor entendimento da regulação do metabolismo em organismos em que as proteínas PII são atuantes em resposta a modificação covalente catalisada por GlnD em resposta a percepção dos níveis de glutamina intracelular. Os resultados obtidos neste trabalho poderão contribuir para a obtenção da estrutura de GlnD em trabalhos futuros.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O nitrogênio é um importante constituinte de ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas, enzimas, vitaminas e outros compostos essenciais para todas as células. Por isso, todo o processo da vida é dependente de moléculas contendo nitrogênio e do metabolismo de nitrogênio (Dixon & Kahn, 2004). Contudo, a absorção de nitrogênio e sua transferência para esqueletos de carbono são processos que devem ocorrer de forma coordenada, por meio da comunicação entre os metabolismos de nitrogênio, carbono e energia. Uma molécula que parece ter papel central na coordenação metabólica de carbono e nitrogênio é o 2-oxoglutarato (2-OG), o qual é intermediário de uma das vias mais fundamentais do metabolismo de carbono, o ciclo de Krebs, e é o principal esqueleto carbônico para reações de assimilação de nitrogênio. O número de vias metabólicas reguladas por 2-OG descritos é amplo e ainda crescente (Huergo & Dixon, 2015). O 2-OG tem sido considerado o metabólito regulador global do metabolismo, e é relacionado a diminuição da produção de cAMP e consequente diminuição da ativação de vias catabólicas, logo, favorecendo vias anabólicas (You *et al.*, 2013). As proteínas PII ligam 2-OG de forma alostérica e conforme as flutuações de 2-OG, que ocorrem de forma dependente da disponibilidade de nitrogênio e carbono (Reyes-Ramirez *et al.*, 2001; Schumacher *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013), estas proteínas regulam uma vasta gama de alvos por interação proteína-proteína, caracterizando as proteínas PII como integradoras do metabolismo de carbono e nitrogênio.

As proteínas PII são mais amplamente descritas como atuantes na regulação do metabolismo de nitrogênio (Huergo, Chandra & Merrick, 2012), contudo, neste trabalho, foram apresentados dados que mostram que as funções de PII são mais abrangentes e estendem-se também ao metabolismo de carbono, regulando a acetil-CoA carboxilase (ACC), enzima essencial e amplamente distribuída na natureza (Waldrop & Cronan, 2002). A regulação de ACC por proteínas PII parece ser evento bastante conservado, pois é descrito em planta (Ferria Bourrelier, 2010; Baud *et al.*, 2010) em bactérias (este trabalho; Rodrigues *et al.*, 2014), em alga (Zalutskaya *et al.*, 2015) e cianobactéria (Hauf *et al.*, 2016).

A regulação da enzima ACC, que catalisa a primeira e irreversível etapa da síntese de ácidos graxos, por proteínas PII pode implicar em importante contribuição biotecnológica, pois é conhecido que o aumento dos níveis do produto da reação catalisada pela ACC, o malonil-CoA, aumenta o rendimento da produção de ácidos graxos em bactérias geneticamente modificadas. Os ácidos graxos de origem bacteriana podem ser utilizados para produção de cosméticos, de medicamentos e de biocombustíveis (Lennen & Pfleger, 2012). Ácidos graxos podem ser transformados quimica ou enzimaticamente em biodiesel e gasolina (Howards *et al.*, 2013; Choi & Lee *et al.*, 2013), contendo hidrocarbonetos estruturalmente semelhantes aos combustíveis utilizados na maioria dos motores disponíveis no mercado, os quais são dependentes de petróleo como matéria prima. Portanto, a

otimização da produção de ácidos graxos de origem microbiana pode vir a ser fonte renovável de biocombustíveis.

Além das contribuições biotecnológicas associadas a produção de ácidos graxos, o melhor entendimento da regulação da enzima ACC também pode ser aplicável no campo da agricultura e da medicina. A enzima ACC pode ser alvo para o desenvolvimento de novos e mais eficientes herbicidas. E também, devido a necessidade de se encontrar novos antibióticos ser crescente, principalmente contra bactérias Gram-negativas, a ACC tem se tornado alvo promissor, uma vez que é uma enzima amplamente distribuída e essencial para a viabilidade celular (Tong, 2013).

Embora seja uma enzima bastante importante, não se sabe muito sobre a regulação da ACC multi-subunidade bacteriana ou de plantas, tampouco se conhece a estrutura da ACC multi-subunidade envolvendo a BCCP inteira ou a estrutura do complexo completo por todas as subunidades de ACC. A resolução da estrutura da ACC multi-subunidade bacteriana é uma difícil tarefa devido as características particulares de suas subunidades, especialmente a BCCP, as quais não favorecem abordagens estruturais por difração de raio-X. Além disso, a falta de conhecimento que se tem sobre a regulação da ACC possivelmente tem sido determinante para o insucesso em estudos estruturais. Acredita-se que o melhor entendimento da regulação da expressão dos genes *acc* poderiam possibilitar a determinação de estratégia que possibilite a expressão das subunidades de forma apropriada e passível de utilização para estudos estruturais. Neste trabalho, a apresentação da descoberta e caracterização da interação PII-BCCP em bactéria contribui de forma a adicionar mais um elemento a ser explorado no estudo da ACC e suas aplicações.

Este trabalho contribui também apresentando e caracterizando uma importante função de PII até então não conhecida em bactéria. Nesse contexto, se faz bastante importante também a obtenção de conhecimento sobre como as proteínas PII são reguladas. A enzima bifuncional GlnD tem papel de perceber os níveis de glutamina intracelular e uridililar/desuridililar PII de acordo com esses níveis. Neste trabalho, contribuiu-se com importantes avanços para futuros estudos estruturais da enzima GlnD, visto que foi encontrada condição reprodutível de purificação e de cristalização desta enzima.

Os dados apresentados neste trabalho possibilitam sugerir que quando sob condições suficientes de nitrogênio, em que os níveis de 2-OG são baixos e de glutamina são altos, a GlnB não é uridililada e interage com a enzima ACC, reduzindo a atividade desta enzima, realizando um ajuste fino no controle da taxa de produção de malonil-CoA, e assim, controlando a síntese de ácidos graxos sob suficiência de carbono. Por outro lado, sob privação de nitrogênio ocorre acúmulo de 2-OG, enquanto os níveis de glutamina são reduzidos (Yuan *et al.*, 2009; Radchenko *et al.*, 2010; Schumacher *et al.*, 2013) e sob tais condições as proteínas PII são uridililadas por GlnD (Jiang, Peliska & Ninfa, 1998), impedindo a interação de PII com ACC, embora, neste caso, o sinal de aumento de 2-OG seja predominante sinal de não favorecimento da interação PII-ACC.

Contudo, os níveis de 2-OG são determinados de acordo com a disponibilidade de nitrogênio e carbono, assim, em caso de queda na quantidade de carbono disponível, ocorre diminuição dos níveis de 2-OG (Yan *et al.*, 2011), favorecendo a interação GlnB-ACC, assim, inibindo mais fortemente a atividade da ACC. Por outro lado, quando sob choque de carbono (fornecimento de glucose em células sob privação), ocorre um rápido aumento de 2-OG na célula (Zhang *et al.*, 2013), desfavorecendo a interação PII-ACC e propiciando máxima absorção de carbono. Esse sistema de regulação está de acordo com a inibição por 2-OG da produção de cAMP (You, *et al.*, 2013), diminuindo, assim, a expressão de enzimas catabólicas de carbono. Pois desta forma, por meio da ligação nas proteínas PII, o 2-OG estaria favorecendo finamente a atividade de uma enzima anabólica, a ACC, coordenando o anabolismo e o catabolismo de carbono com o estado energético e o metabolismo de nitrogênio. No entanto, entende-se que a dinâmica metabólica em processos de percepção e resposta a disponibilidade nutricional é bastante complexa e ocorre de forma integrada, havendo muito para ser entendido sobre como a célula coordena seu metabolismo de acordo com os sinais ambientais.

7 CONCLUSÕES

- A proteína BCCP é uma proteína alvo das proteínas PII em *E. coli*, GlnK e GlnB, formando complexo com PII, BCCP e BC *in vitro*.
- Para a formação de complexo ternário PII-BCCP-BC é necessária a presença de MgATP, no entanto, o principal regulador desse complexo é o 2-OG, que desfavorece a interação entre PII e BCCP-BC sob mais altas concentrações.
- A região do *loop*-T de PII é determinantemente importante para a interação com BCCP-BC.
- A proteína GlnB é reguladora da atividade da enzima ACC. Inibição da ACC foi observada pela análise direta dos níveis de malonil-CoA formado *in vitro* e *in vivo*.
- Estirpes de *E. coli* mutantes PII apresentam aumento da síntese de ácidos graxos em *E. coli*, sugerindo que ocorre inibição da ACC por PII *in vivo*, reduzindo a síntese de ácidos graxos sob condições suficientes de nitrogênio e carbono.
- Estirpes de *E. coli* geneticamente modificadas para fins de super-produção de ácidos graxos podem apresentar aumento de produtividade desses compostos pela mutação dos genes codificantes das proteínas PII.
- A estirpe de *E. coli* selvagem ET8000 é 5% maior em tamanho que a estirpe mutante *glnB* e 49% maior que a estirpe duplo-mutante *glnB/glnK*. Além disso, a super-expressão de *TesA* gera aumento de 7%, 12% e 22% nas estirpes ET8000, PT8000 e FT8000, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMID, A. M. & CRONAN JR, J. E., Coordinate Expression of the Acetyl Coenzyme, A Carboxylase Genes, *accB* and *accC*, Is Necessary for Normal Regulation of Biotin Synthesis in *Escherichia coli*, **J. Bacteriol.**, v. 189, n. 2, p. 369, 2007.
- ABDULNOUR-NAKHOUL S., LE T., RABON E., HAMM L.L., NAKHOUL N.L., Structural determinants of NH₃ and NH₄⁺ transport by mouse Rhbg, a renal Rh glycoprotein, **Am J Physiol Renal Physiol**. 2016 Dec 1;311(6):F1280-F1293, 2016.
- ABU-ELHEIGA L., BRINKLEY W.R., ZHONG L., CHIRALA S. S., WOLDEG-IORGIS G., WAKIL S. J., The subcellular localization of acetyl- 5773, CoA carboxylase 2. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 97, p. 1444–1449, 2000.
- ÅKERLUND, T., K. NORDSTRÖM, & R. BERNANDER, Analysis of cell size and DNA content in exponentially growing and stationary-phase batch cultures of *Escherichia coli*, **J. Bacteriol.**, 177:6791-6797, 1995.
- ALIBHAI, M., & VILLAFRANCA, J. J., Kinetic and mutagenic studies of the role of the active site residues Asp-50 and Glu-327 of *Escherichia coli* glutamine synthetase. **Biochemistry**, v. 33, n. 3, p. 682-686, 1994.
- AMON J., TITGEMEYER F. & BURKOVSKI A., Common patterns – unique features: nitrogen metabolism and regulation in Gram-positive bacteria. **FEMS Microbiol Rev** 34: 588–605, 2010.
- ARAÚJO, L.M., HUERGO, L.F., INVITTI, A.L., GIMENES, C.I., BONATTO, A.C., MONTEIRO, R.A., SOUZA, E.M., PEDROSA, F.O., CHUBATSU, L.S. Different responses of the GlnB and GlnZ proteins upon *in vitro* uridylation by the *Azospirillum brasilense* GlnD protein. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.41, n.4, p.289-294, 2008.
- ARAÚJO, M. S., BAURA, V. A., SOUZA, E. M., BENELLI, E. M., RIGO, L. U., STEFFENS, M. B. R., PEDROSA, F. O., e CHUBATSU, L. S., *In vitro* uridylation of the *Azospirillum brasilense* N-signal transducing GlnZ protein, **Protein Expr. Purif.**, v. 33, p. 19-24, 2004.
- ARAVIND, L., & KOONIN E. V., The HD domain defines a new super- family of metal-dependent phosphohydrolases, **Trends Biochem Sci**, v. 23, p. 469–472, 1998.
- ARCONDÉGUY T., JACK R. & MERRICK M., PII signal transduction proteins: pivotal players in microbial nitrogen control. **Microbiol Mol Biol Rev** v. 65, p. 80–105, 2001.
- ATHAPPILLY, F. K., & HENDRICKSON, W. A., Structure of the biotinyl domain of acetyl- coenzyme A carboxylase determined by MAD phasing, **Structure** 3, p. 1407-1419, 1995.
- ATKINSON M.R., NINFA A.J., Characterization of the GlnK protein of *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** v. 32, p. 301–313, 1999.
- ATKINSON M.R., NINFA A.J., Role of the GlnK signal transduction protein in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** v 29, p., 431– 447, 1998.
- ATTWOOD, P. V., & WALLACE, J. C., Chemical and catalytic mechanisms of carboxyl transfer reactions in biotin-dependent enzymes, **Accounts of chemical research**, v. 35, n. 2, p. 113-120, 2002.
- BABA, T., ARA, T., HASEGAWA M., TAKAI Y., OKUMURA Y., BABA M., ... & MORI H., Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. **Molecular systems biology**, v. 2, n. 1, 2006.

- BARBER, M.C., PRICE, N.T., & TRAVERS, M.T., Structure and regulation of acetyl-CoA carboxylase genes of metazoa. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1733, n. 1, p. 1-28, 2005.
- BATTESTI, A., MAJDALANI, N., & GOTTESMAN, S., The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. **Annual review of microbiology**, v. 65, p. 189-213, 2011.
- BAUD S, FERIA BOURRELLIER AB, AZZOPARDI M, BERGER A, DECHORGNAT J, DANIEL-VEDELE F, LEPINIEC L, MIQUEL M, ROCHAT C, HODGES M, FER- RARIO-MERY S., PII is induced by WRINKLED1 and fine-tunes fatty acid composition in seeds of *Arabidopsis thaliana*, **Plant J**, v. 64, p. 291–303, 2010.
- BELD, J., FINZEL, K., & BURKART, M. D., Versatility of acyl-acyl carrier protein synthetases. **Chemistry & biology**, v. 21, n. 10, p. 1293-1299, 2014.
- BENNETT, B. D., KIMBALL, E. H., GAO, M., OSTERHOUT, R., VAN DIEN, S. J., & RABINOWITZ, J. D., Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. **Nature chemical biology**, v. 5, n. 8, p. 593-599, 2009.
- BILDER, P., LIGHTLE, S., BAINBRIDGE, G., OHREN, J., FINZEL, B., SUN, F., HOLLEY, S., AL-KASSIM, L., SPESSARD, C., MELNICK, M., The structure of the carboxyltransferase component of acetyl-coA carboxylase reveals a zinc-binding motif unique to the bacterial enzyme, **Biochemistry**, v. 45, p. 1712-1722, 2006.
- BLANCHARD, C. Z., LEE, Y. M., FRANTOM, P. A., e WALDROP, G. L., Mutations at four active site residues of biotin carboxylase abolish substrate-induced synergism by biotin. **Biochemistry**, v. 38, p. 3393-3400, 1999.
- BONATTO, A. C., COUTO, G. H., SOUZA, E. M., ARAUJO, L. M., PEDROSA, F. O., NOINDORF, L. & BENELLI, E. M., Purification and characterization of the bifunctional uridylyltransferase and the signal transducing proteins GlnB and GlnK from *Herbaspirillum seropedicae*, **Protein Expr. Purif.**, v. 55, p. 293–299, 2007.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilization: the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p. 248-254, 1976.
- BROUSSARD, T. C., KOBE, M. J., PAKHOMOVA, S., NEAU, D. B., PRICE, A. E., CHAMPION, T. S., e WALDROP, G. L., The Three-Dimensional Structure of the Biotin Carboxylase-Biotin Carboxyl Carrier Protein Complex of *E. coli* Acetyl-CoA Carboxylase, **Structure**, v. 21, p. 650-657, 2013.
- BROWN, RN & GULIG, PA, Regulation of fatty acid metabolism by FadR is essential for *Vibrio vulnificus* to cause infection of mice. **Journal of bacteriology**, v. 190, n. 23, p. 7633-7644, 2008.
- CANFIELD, D. E., GLAZER, A. N., FALKOWSKI, P. G., The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle, **Science**, v. 330, n. 6001, p. 192-196, 2010
- CAMPBELL, J. W. & CRONAN, J. E., *Escherichia coli* FadR positively regulates transcription of the *fabB* fatty acid biosynthetic gene. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 20, p. 5982-5990, 2001.
- CARR P.D., CHEAH E., SUFFOLK P.M., VASUDEVAN S.G., DIXON N.E. & OLLIS D.L., X-ray structure of the signal transduction protein PII from *Escherichia coli* at 1.9 Å. **Acta Crystallogr**, D52: p. 93–104, 1996.
- CHALUPSKA D., LEE H.Y., FARIS J.D., EVRARD A., CHALHOUB B., HASELKORN R., GORNICKI P., *Acc* homoeoloci and the evolution of wheat genomes, **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 105, p. 9691–9696, 2008.

- CHAPMAN A. G., FALL L., ATKINSON D. E., Adenylate energy charge in *Escherichia coli* during growth and starvation, **J. Bacteriol**, v. 108, p. 1072–1086, 1971.
- CHAPMAN-SMITH A., TURNER D. L., CRONAN J. E. JR, MORRIS T. W., WALLACE J. C., Expression, biotinylation and purification of a biotin-domain peptide from the biotin carboxy carrier protein of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. **Biochem J**, v. 302, p. 881–887, 1994.
- CHAPMAN-SMITH, A. e CRONAN JR, J. E., Molecular biology of biotin attachment to proteins, **The Journal of Nutrition**, v. 129, p. 477S-484S, 1999b.
- CHAPMAN-SMITH, A., e CRONAN JR, J. E., The enzymatic biotinylation of proteins: a post- translational modification of exceptional specificity. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 24, p. 359-363, 1999a.
- CHEAH, E., CARR, P. D., SUFFOLK, P. M., VASUDEVAN, S. G., DIXON, N. E. & OLLIS, D. L., Structure of *Escherichia coli* signal transducing protein PII, **Structure**, v. 2, p. 981-990, 1994.
- CHEN H., KIM H.U., WENG H., BROWSE J., Malonyl-CoA synthetase, encoded by ACYL ACTIVATING ENZYME 13, is essential for growth and development of *Arabidopsis*. **Plant Cell** v. 23, p. 2247–2262, 2013.
- CHO H & CRONAN J.E., Defective export of a periplasmic enzyme disrupts regulation of fatty acid synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 9, p. 4216-4219, 1995.
- CHO, Y. S., LEE, J. I., SHIN, D., KIM, H. T., JUNG, H. Y., LEE, T. G., ... & HEO, Y. S, Molecular mechanism for the regulation of human ACC2 through phosphorylation by AMPK. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 391, n. 1, p. 187-192, 2010.
- CHOI-RHEE, E. & CRONAN JR, J. E., The Biotin Carboxylase-Biotin Carboxyl Carrier Protein Complex of *Escherichia coli* Acetyl-CoA Carboxylase, **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 33, p. 30806–30812, 2003.
- CHOI Y. J. & LEE S. Y, Microbial production of short-chain alkanes, **nature**, v. 502, p. 571-575, 2013.
- CHOU C.Y. & TONG L., Structural and biochemical studies on the regulation of biotin carboxylase by substrate inhibition and dimerization, **J Biol Chem** v. 286, p. 24417–24425, 2011.
- CHOU, C. Y., YU, L. P. C. e TONG, L., Crystal Structure of Biotin Carboxylase in Complex with Substrates and Implications for Its Catalytic Mechanism, **J. Biol. Chem.**, v. 284, p. 11690-11697, 2009.
- CHUNG, C. T., NIEMELA, S. L., MILLER, R. H., One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution, **pnas**, 74 v.86, p.2172-2175, 1989.
- COLBERT, C. L., KIM, C. W., MOON, Y. A., HENRY, L., PALNITKAR, M., MCKEAN, W. B., ... & KWON, H. J., Crystal structure of Spot 14, a modulator of fatty acid synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 44, p. 18820-18825, 2010.
- COMMICHAU F. M., FORCHHAMMER K. & STULKE J., Regulatory links between carbon and nitrogen metabolism, **Curr Opin Microbiol**, v9, p. 167–172, 2006.
- CONROY M. J., DURAND A., LUPO D., LI X. D., BULLOUGH P. A., WINKLER, F. K. & MERRICK M, The crystal structure of the *Escherichia coli* AmtB–GlnK complex reveals how GlnK regulates the ammonia channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 4, p. 1213-1218, 2007.
- COUTTS G., THOMAS G., BLAKEY D. & MERRICK M., Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB, **EMBO J**, n. 21, p. 536–545, 2002.
- CRONAN J.E, Biotin and Lipoic Acid: Synthesis, Attachment, and Regulation, **Eco Sal Plus**, p. 1-37, 2008.
- CRONAN JR, J. E. & WALDROP, G. L., Multi-Subunit Acetyl-CoA Carboxylases, **Progress in Lipid Research**, n. 41, p. 407–435, 2002.

- CRONAN J. E. Jr., The *E. coli* bio operon: transcriptional repression by an essential protein modification enzyme. **Cell**, v. 58, p. 427-429, 1989.
- CRUZ-HIPOLITO, H., OSUNA, M. D., DOMÍNGUEZ-VALENZUELA, J. A., ESPINOZA, N., & DE PRADO, R., Mechanism of resistance to ACCase-inhibiting herbicides in wild oat (*Avena fatua*) from Latin America. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 13, p. 7261-7267, 2011.
- DAVIS, M. S. & CRONAN JR, J. E., Inhibition of *Escherichia coli* acetyl-coenzyme A carboxylase by acyl-acyl carrier protein. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 1499-1503, 2001.
- DAVIS, M.S., SOLBIATI J. & CRONAN J., Overproduction of acetyl-CoA carboxylase activity increases the rate of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*, **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 28593–28598, 2000.
- DESBOIS A. P, SMITH V. J., Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential, **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 85, p. 1629–42, 2010.
- DÉLYE, C., MATÉJICEK, A., & MICHEL, S., Cross-resistance patterns to ACCase-inhibiting herbicides conferred by mutant ACCase isoforms in *Alopecurus myosuroides* Huds.(black-grass), re-examined at the recommended herbicide field rate. **Pest management science**, v. 64, n. 11, p. 1179-1186, 2008.
- DELLOMONACO C, CLOMBURG JM, MILLER EN, GONZALEZ R, Engineered reversal of the beta-oxidation cycle for the synthesis of fuels and chemicals, **Nature**, v. 476, p. 355–359, 2011.
- DEVINE, M. D., & SHUKLA, A., Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance. **Crop Protection**, v. 19, n. 8, p. 881-889, 2000.
- DIXON R. & KAHN D., Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nat Rev Microbiol** n. 2, p. 621–631, 2004.
- DODSWORTH J.A, CADY N.C. & LEIGH J.A., 2-Oxoglutarate and the PII homologues NifI₁ and NifI₂ regulate nitrogenase activity in cell extracts of *Methanococcus maripaludis*. **Mol Microbiol**, n. 56 p. 1527–1538, 2005.
- DONACHIE W. D., Relationship between cell size and time of initiation of DNA replication, **Nature** 219:1077–1079, 1968.
- DREPPER T., GROSS S., YAKUNIN A.F., HALLENBECK P.C., MASEPOHL B. & KLIPP W., Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase systems in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **Microbiology**, v. 149, p. 2203– 2212, 2003.
- DURAND, A. & MERRICK, M., *In vitro* analysis of the *Escherichia coli* AmtB-GlnK complex reveals a stoichiometric interaction and sensitivity to ATP and 2-oxoglutarate, **J Biol. Chem**, v. 281, p. 29558-29567, 2006.
- EISENBERG D., GILL H.S., PFLUEGL G.M. & ROTSTEIN S.H., Structure–function relationships of glutamine synthetases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1477, p. 122–145, 2000.
- ENGLEMAN, E. G., AND S. H. FRANCIS, Cascade control of *E. coli* glutamine synthetase. II. Metabolite regulation of the enzymes in the cascade, **Arch. Biochem. Biophys.**, 191:602–612, 1978.
- EVANS A., RIBBLE W., SCHEXNAYDRE E., WALDROP G. L., Acetyl-CoA carboxylase in *Escherichia coli* exhibits a pronounced hysteresis when inhibited by palmitoyl-acyl carrier protein, **ABB**, artigo aceito, 2017.
- FALL R. R., & VAGELOS P. R., Acetyl-CoA carboxylase: molecular forms and subunit composition of biotin carboxyl carrier protein. **J. Biol. Chem**, v. 247, p. 8005-8015, 1972.

FOKINA O., CHELLAMUTHU V. R., FORCHHAMMER K. & ZETH K., Mechanism of 2-oxoglutarate signaling by the *Synechococcus elongatus* PII signal transduction protein. **P Natl Acad Sci USA**, v. 107, p. 19760–19765, 2010.

FOKINA O., CHELLAMUTHU V. R., ZETH K. & FORCHHAMMER K., A novel signal transduction protein PII variant from *Synechococcus elongatus* PCC 7942 indicates a two-step process for NAGK–PII complex formation. **J Mol Biol**, v. 399, p. 410–421, 2010b.

FOO J. L., JENSEN H. M., ROBERT H., GEORGE D. K., KEASLING J. T., LEE T. S., LEONG S., MUKHOPADHYAY A., Improving Microbial Biogasoline Production in *Escherichia coli* Using Tolerance Engineering, **mBio**, v. 5, p. e01932-14, 2014.

FORCHHAMMER K & TANDEAU DE MARSAC N, Phosphorylation of the PII protein (glnB gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus sp.* strain PCC 7942: analysis of in vitro kinase activity. **J Bacteriol**, 177: 5812–5817, 1995.

FORCHHAMMER, K., Glutamine signalling in bacteria. **Front. Biosci.**, v. 12, p. 358–370, 2007.

FORCHHAMMER K. & TANDEAU D.E., MARSAC N., The PII protein in the cyanobacterium *Synechococcus sp.* strain PCC 7942 is modified by serine phosphorylation and signals the cellular N-status. **J Bacteriol**, v. 176, p. 84–91, 1994.

FORCHHAMMER K. & LÜDDECKE J., Sensory properties of the PII signalling protein family **FEBS Journal**, v. 283, p. 425–437, 2016.

FORCHHAMMER K., PII signal transducers: novel functional and structural insights, **Trends in Microbiol.** v.16, n.2, p.65-72, 2008.

GERHARDT E. C., ARAUJO L. M., RIBEIRO R. R., CHUBATSU L. S., SCARDUELLI M., RODRIGUES T. E., MONTEIRO R. A., PEDROSA F. O., SOUZA E. M. & HUERGO L. F. Influence of the ADP/ATP ratio, 2-oxoglutarate and divalent ions on *Azospirillum brasilense* PII protein signaling, **Microbiology**, v. 158, p. 1656–1663, 2012.

GERHARDT E. C.*, RODRIGUES T. E.*, MÜLLER-SANTOS M., PEDROSA F. O., SOUZA E. M., FORCHHAMMER K., HUERGO L. F., The bacterial signal transduction protein GlnB regulates the committed step in fatty acid biosynthesis by acting as a dissociable regulatory subunit of acetyl-CoA carboxylase, **Mol Microbial.**, v. 95, n. 6, p. 1025–1035, 2015. (* autores com igualdade de contribuição)

GOWRISHANKAR, J. & HARINARAYANAN, R., Why is transcription coupled to translation in bacteria?, **Molecular microbiology**, v. 54, n. 3, p. 598-603, 2004.

GRANT G.A., The ACT Domain: A Small Molecule Binding Domain and Its Role as a Common Regulatory Element, 10, v. 281, n. 45, 2006.

GREEN, N. Michael. Avidin. **Advances in protein chemistry**, v. 29, p. 85-133, 1975.

GRONWALD J.W., Lipid biosynthesis inhibitors. **Weed Sci**, v. 39, n. 3, p. 435-449, 1991.

GUNDLACH J., DICKMANN A., SCHRÖDER-TITTMANN K., NEUMANN P., KAESLER J., KAMPF J., HERZBERG C., HAMMER E., SCHWEDE F., KAEVER V, TITTMANN K., STÜLKE J. AND FICNER R., Identification, Characterization, and Structure Analysis of the Cyclic di-AMP-binding PII like Signal Transduction Protein DarA, **The J. of Bacteriol. Chem.**, v.290, n. 5, p. 3069–3080, 2015.

HAUF W., SCHMID K., GERHARDT E. C. M., HUERGO L. F. & FORCHHAMMER K., Interaction of the Nitrogen Regulatory Protein GlnB (PII) with Biotin Carboxyl Carrier Protein (BCCP) Controls Acetyl-CoA Levels in the *Cyanobacterium Synechocystis sp.* PCC 6803, **Front. Microbiol.**, v. 7, p. 1700, 2016.

HAMED, R. B., BATCHELAR, E. T., CLIFTON, I. J., & SCHOFIELD, C. J., Mechanisms and structures of crotonase superfamily enzymes—how nature controls enolate and oxyanion reactivity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 16, p. 2507–2527, 2008.

HANDKE P., LYNCH S.A., & GILL, R.P., Application and engineering of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli* for advanced fuels and chemicals, **Metabolic Engineering**, v. 13, p. 28–37, 2011.

HEATH R. J. & ROCK C. O. Regulation of fatty acid elongation and initiation by acyl-acyl carrier protein in *Escherichia coli*, **J. Biol. Chem**, v. 271, p. 1833–1836, 1996.

HESKETH A., FINK D., GUST B., REXER H.U., SCHEEL B., CHATER K., WOHLLEBEN W. & ENGELS A., The GlnD and GlnK homologues of *Streptomyces coelicolor* A3(2) are functionally dissimilar to their nitrogen regulatory system counterparts from enteric bacteria. **Mol Microbiol**, v. 46, p. 319–330, 2002.

HILTUNEN J.K., CHEN Z., HAAPALAINEN A.M., WIERENGA R.K., KASTANIOTIS A.J., Mitochondrial fatty acid synthesis - an adopted set of enzymes making a pathway of major importance for the cellular metabolism, **Prog Lipid Res**, v. 49, p. 27–45, 2010.

HOFER, U., MUEHLEBACH, M., HOLE, S., & ZOSCHKE, A., Pinoxaden-for broad spectrum grass weed management in cereal crops. **ZEITSCHRIFT FÜR PFLANZENKRANKHEITEN UND PFLANZENSCHUTZ-SONDERHEFT**, v. 20, p. 989, 2006.

HOJA U., MARTHOL S., HOFMANN J., STEGNER S., SCHULZ R., MEIER S., GREINER E., SCHWEIZER E., HFA1 encoding an organelle-specific acetyl-CoA carboxylase controls mitochondrial fatty acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, **J Biol Chem**, 279:21779–21786, 2004.

HOWARD T.P., MIDDELHAUFE S., MOORE K., EDNER C., KOLAK D.M., TAYLOR G.N., Parkera D. A., Leea, R., Smirnoffa, N., Avesa, S. J. E e Lovea, J., Synthesis of customized petroleum-replica fuel molecules by targeted modification of free fatty acid pools in *Escherichia coli*. **pnas** v. 110, p. 7636-7641, 2013.

HUERGO L.F., CHUBATSU L. S., SOUZA E. M., PEDROSA F. O., STEFFENS M. B., MERRICK, M., Interactions between PII proteins and the nitrogenase regulatory enzymes DraT and DraG in *Azospirillum brasilense*. **FEBS Lett.** v.580, n. 22, p. 5232-6, 2006.

HUERGO L. F., FILIPAKI A., CHUBATSU L.S., YATES M.G., STEFFENS M.B., PEDROSA F.O. & SOUZA E.M., Effect of the over- expression of PII and PZ proteins on the nitrogenase activity of *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 253, p. 47–54, 2005.

HUERGO, L. F., CHANDRA, G. & MERRICK, M., PII signal transduction proteins: nitrogen regulation and beyond, **FEMS**, 2012.

HUERGO, L. F., NOINDORF, L., GIMENES, C., LEMGRUBER, R. S. P., CORDELLINI, D. F., FALARZ, L. J., CRUZ, L. M., MONTEIRO, R. A., PEDROSA, F. O., CHUBATSU, L. S., SOUZA E. M. & STEFFENS, M B.R., Proteomic analysis of *Herbaspirillum seropedicae* reveals ammonium-induced AmtB-dependent membrane sequestration of PII proteins, **FEMS Microbiol Lett**, v. 308, p. 40–47, 2010.

HUERGO, L.F. & DIXON, R., The emergence of 2-oxoglutarate as a master regulator metabolite, **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 4, p. 419-435, 2015.

HÜGLER M., MENENDEZ C., SCHÄGGER H., & GEORG FUCHS, Malonyl-Coenzyme A Reductase from *Chloroflexus aurantiacus*, a Key Enzyme of the 3-Hydroxypropionate Cycle for Autotrophic CO₂ Fixation, **J. of Bacteriol.**, p. 2404–2410, 2002.

IRMLER A. & FORCHHAMMER K., A PP2C-type phosphatase dephosphorylates the PII signaling protein in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. **P Natl Acad Sci USA**, v. 98, p. 12978–12983, 2001.

ISHIHAMA Y., SCHMIDT T., RAPPSILBER J., MANN M., HARTL F.U., KERNER M.J., FRISHMAN D.,

- Protein abundance profiling of the *Escherichia coli* cytosol, **BMC Genomics**, n. 9, 2008.
- ISKEN S. & DE BONT J.A., Bacteria tolerant to organic solvents, **Extremophiles**, v. 2, p. 229–238, 1998.
- JAGGI, R., YBARLUCEA, W., CHEAH E, CARR PD, EDWARDS KJ, OLLIS D & VASUDEVAN SG The role of the T-loop of the signal transducing protein PII from *Escherichia coli*, **FEBS**, n. 391, p. 223–228, 1996.
- JAMES, E. S., e CRONAN JR, J. E., Expression of two *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase subunits is autoregulated, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 2520–2527, 2004.
- JANIYANI K., BORDELON T., WALDROP G.L., CRONAN J.E. JR, Function of *Escherichia coli* biotin carboxylase requires catalytic activity of both subunits of the homodimer. **J Biol Chem**, v. 276, p. 29864–29870, 2001.
- JANBEN, H. J. & STEINBÜCHEL, A., Fatty acid synthesis in *Escherichia coli* and its applications towards the production of fatty acid based biofuels, **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. 1, p. 7, 2014.
- JANSSEN H. J., STEINBUCHER A., Fatty acid synthesis in *Escherichia coli* and its applications towards the production of fatty acid based biofuels, **Biotechnol Biofuels**, v. 7, p. 7, 2014.
- JAVELLE A., SEVERI E., THORNTON J., MERRICK M., Ammonium sensing in *Escherichia coli*. Role of the ammonium transporter AmtB and AmtB-GlnK complex formation, **J Biol. Chem**, v. 279, p. 8530–8538, 2004.
- JAVELLE A., THOMAS G., MARINI A. M., KRAMER R. & MERRICK M., *In vivo* functional characterization of the *Escherichia coli* ammonium channel AmtB: evidence for metabolic coupling of AmtB to glutamine synthetase, **Biochem. J.**, v. 390, p. 215–222, 2005.
- JAHANDIDEH S., JAROSZEWSKI L., & GODZIK A., Improving the chances of successful protein structure determination with a random forest classifier, **Biological Crystallography**, v. 70, p. 627–635, 2014.
- JIANG P., ZUCKER P., ATKINSON M.R., KAMBEROV E.S., TIRASOPHON W., CHANDRAN P., SCHEPKE B.R. & NINFA A.J., Structure/function analysis of the PII signal transduction protein of *Escherichia coli*: genetic separation of interactions with protein receptors, **J. Bacteriol.**, n. 179, p. 4342–4353, 1997a.
- JIANG P. & NINFA A.J., Sensation and signaling of alpha- ketoglutarate and adenylylate energy charge by the *Escherichia coli* PII signal transduction protein require cooperation of the three ligand-binding sites within the PII trimer. **Biochemistry**, v. 48, p. 11522–11531, 2009.
- JIANG P., VENTURA A.C. & NINFA A.J., Characterization of the Reconstituted UTase/UR-PII-NRII-NRI Bicyclic Signal Transduction System that Controls the Transcription of Nitrogen-Regulated (Ntr) Genes in *Escherichia coli*, **Biochemistry**, v. 51, p. 9045–9057, 2012.
- JIANG P. & CRONAN J. E., Inhibition of fatty acid synthesis in *Escherichia coli* in the absence of phospholipid synthesis and release of inhibition by thioesterase action. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 10, p. 2814–2821, 1994.
- JIANG P. & NINFA A. J., *Escherichia coli* PII signal transduction protein controlling nitrogen assimilation acts as a sensor of adenylylate energy charge *in vitro*, **Biochemistry**, v. 13, n.46(45), p. 12979–12996, 2007.
- JIANG, P., PELISKA, J. A., NINFA, A. J., Enzymological characterization of the signal- transducing uridylyltransferase/uridylyl removing enzyme (EC 2.7.7.59) of *Escherichia coli* and its interaction with the PII protein. **Biochemistry**, v. 37, p.12782–12794, 1998.
- JIANG, P., ZUCKER, P. e NINFA, A. J., Probing interactions of the homotrimeric PII signal transduction protein with its receptors by use of PII heterotrimers formed in vitro from wild- type and mutant subunits, **J. Bacteriol.**, n. 179, p. 4354–4360, 1997b.

- JIANG P., PIOSZAK A. A. & NINFA A. J., Structure-function analysis of glutamine synthetase adenylyltransferase (ATase, EC 2.7.7.49) of *Escherichia coli*, **Biochemistry**, v. 46, p. 4117–4132, 2007.
- JONES A. M., KLUN J. A., CANTRELL C. L., RAGONE D., CHAUHAN K.R., BROWN P. N., MURCH S. J., Isolation and identification of mosquito (*Aedes aegypti*) biting deterrent fatty acids from male infestations of breadfruit (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg), **J Agric Food Chem.**, v. 60, p. 3867–73, 2012.
- KAISER W. M. & HUBER S. C., Post-translational regulation of nitrate reductase in higher plants, **Plant Physiol.**, v. 106, p. 817–821, 1994.
- KAMBEROV E.S., ATKINSON M.R., FENG J., CHANDRAN P. & NINFA A.J., Sensory components controlling bacterial nitrogen assimilation, **Cell Mol Biol Res**, v. 40, p. 175–191, 1994.
- KAMBEROV E. S., ATKINSON M. R. & NINFA A. J., The *Escherichia coli* PII signal transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP, **J. Biol. Chem.**, n. 270, p. 17797–17807, 1995.
- KAROW M., FAYET O. & GEORGOPOULOS C., The lethal phenotype caused by null mutations in the *Escherichia coli* *htrB* gene is suppressed by mutations in the *accBC* operon, encoding two subunits of acetyl coenzyme A carboxylase. **Journal of bacteriology**, v. 174, n. 22, p. 7407–7418, 1992.
- KAUSHIK, V. K., KAVANA, M., VOLZ, J. M., WELDON, S. C., HANRAHAN, S., XU, J., ... & HUBBARD, B. K, Characterization of recombinant human acetyl-CoA carboxylase-2 steady-state kinetics. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1794, n. 6, p. 961–967, 2009.
- KAYUMOV A., HEINRICH A., FEDOROVA K., ILINSKAYA O. & FORCHHAMMER K., Interaction of the general transcription factor TnrA with the PII-like protein GlnK and glutamine synthetase in *Bacillus subtilis*. **FEBS J**, v. 278, p. 1779–1789, 2011.
- KESSLER P. S. & LEIGH J. A., Genetics of nitrogen regulation in *Methanococcus maripaludis*, **Genetics**, v. 152, p. 1343–1351, 1999.
- KIM C. W., MOON Y. A., PARK S. W., CHENG D., KWON H. J., & HORTON J. D., Induced polymerization of mammalian acetyl-CoA carboxylase by MIG12 provides a tertiary level of regulation of fatty acid synthesis, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 21, p. 9626–9631, 2010.
- KIM, J. Y., LEE, J. J., & KIM, K. S, Acetyl-CoA carboxylase [beta] expression mediated by MyoD and muscle regulatory factor 4 is differentially affected by retinoic acid receptor and retinoid X receptor. **Experimental & molecular medicine**, v. 35, n. 1, p. 23, 2003.
- KIM, K., Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase. **Annual review of nutrition**, v. 17, n. 1, p. 77–99, 1997.
- KLASSEN G., DE SOUZA E.M., YATES M.G., RIGO L.U., INABA J. & PEDROSA F.O., Control of nitrogenase reactivation by the GlnZ protein in *Azospirillum brasilense*. **J Bacteriol** 183: 6710–6713, 2001.
- KLOFT N., RASCH G. & FORCHHAMMER K., Protein phosphatase PphA from *Synechocystis* sp. PCC 6803: the physiological framework of PII-P dephosphorylation. **Microbiology**, v. 151, p. 1275–1283, 2005.
- KOSLOVER D. J., FAZAL F. M., MOONEY R. A., LANDICK R., & BLOCK S. M., Binding and translocation of termination factor rho studied at the single-molecule level, **Journal of molecular biology**, v. 423, n. 5, p. 664–676, 2012.
- KOZAKI, A., MAYUMI, K., & SASAKI, Y., Thiol-disulfide exchange between nuclear-encoded and chloroplast-encoded subunits of pea acetyl-CoA carboxylase, **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 43, p. 39919–39925, 2001.
- KREUZ S., SCHOELCH C., THOMAS L., RIST W., RIPPMANN J.F., NEUBAUER H., Acetyl-CoA

carboxylases 1 and 2 show distinct expression patterns in rats and humans and alterations in obesity and diabetes, **Diabetes Metab Res Rev**, v. 25, p. 577–586, 2009.

KUCHTA K, KNIZEWSKI L, WYRWICZ LS, RYCHLEWSKI L E GINALSKI K, Comprehensive classification of nucleotidyltransferase fold proteins: identification of novel families and their representatives in human, **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 22, p. 7701–7714, 2009.

KUNTUMALLA S., BRAISTED J.C., HUANG S.T., PARMAR P.P., CLARK D.J., ALAMI H., ZHANG Q., DONOHUE-ROLFE A., TZIPORI S., FLEISCHMANN R.D., PETERSON S.N., PIEPER R., Comparison of two label-free global quantitation methods, APEX and 2D gel electrophoresis, applied to the *Shigella dysenteriae* proteome. **Proteome Sci**. v. 7, p. 22, 2009.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T7. **Nature**, v.277, p. 680-685, 1970.

LANE D.M., YOUNG D.L. & LYNES F., The Enzymatic Synthesis of Holotranscarboxylase from Apotranscarboxylase and (+) –Biotin, **J. Biol. Chem.**, v. 239, n. 9, p. 2858-2864, 1964.

LEE C.K., CHEONG H.K., RYU K.S., LEE J.I., LEE W., JEON Y.H., CHEONG C., Biotinoyl domain of human acetyl-CoA carboxylase: structural insights into the carboxyl transfer mechanism, **Proteins**, v. 72, p. 613–624, 2008.

LEIGH J.A. DODSWORTH J. A, Nitrogen regulation in bacteria and archaea, **Annu. Rev. Microbiol**. v.61, p. 349 – 377, 2007.

LENNEN, R. M., BRADEN, D. J., WEST, R. M., DUMESIC, J. A., PFLEGER B. F., A Process for Microbial Hydrocarbon Synthesis: Overproduction of Fatty Acids in *Escherichia coli* and Catalytic Conversion to Alkanes, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 106, n. 2, p. 192- 202, 2010.

LENNEN, R. M., e PFLEGER, B. F., Engineering *Escherichia coli* to synthesize free fatty acids. **Trends Biotechnol**, v. 30, p. 659-667, 2012.

LENNEN R. M., POLITZ M. G., KRUIZIKI M. A., PFLEGER B. F., Identification of Transport Proteins Involved in Free Fatty Acid Efflux in *Escherichia coli* , **J. bacteriol.**, v. 195, p. 135-144, 2013.

LI S. & CRONAN J.E., The genes encoding the two carboxyltransferase subunits of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase, **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 24, p. 16841-16847, 1992.

LI X., ILARSLAN H., BRACHOVA L., QIAN H.R., LI L., CHE P., WURTELE E.S., NIKOLAU B.J., Reverse-genetic analysis of the two biotin-containing subunit genes of the heteromeric acetyl-coenzyme A carboxylase in *Arabidopsis* indicates a unidirectional functional redundancy, **Plant Physiol**, v. 155, p. 293–314, 2011.

LI, G. W., BURKHARDT, D., GROSS, C., & WEISSMAN, J. S., Quantifying absolute protein synthesis rates reveals principles underlying allocation of cellular resources. **Cell**, v. 157, n. 3, p. 624-635, 2014.

LI, S. J., & CRONAN, J. E., Growth rate regulation of *Escherichia coli* acetyl coenzyme A carboxylase, which catalyzes the first committed step of lipid biosynthesis. **Journal of bacteriology**, v. 175, n. 2, p. 332-340, 1993.

LIU, W., HARRISON, D. K., CHALUPSKA, D., GORNICKI, P., O'DONNELL, C. C., ADKINS, S. W., ... & WILLIAMS, R. R., Single-site mutations in the carboxyltransferase domain of plastid acetyl-CoA carboxylase confer resistance to grass-specific herbicides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 9, p. 3627-3632, 2007.

LIU, X., FORTIN, P. D., & WALSH, C. T., Andrimid producers encode an acetyl-CoA carboxyltransferase subunit resistant to the action of the antibiotic. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 36, p. 13321-13326, 2008.

- LIU H., YU C., FENG D., CHENG T., MENG X., LIU W., ZOU H., XIAN M., Production of extracellular fatty acid using engineered *Escherichia coli*. **Microb. Cell Fact**, v. 11, p. 41, 2012.
- LU S., ZHAO H., PARSONS E.P., XU C., KOSMA D.K., XU X., CHAO D., LOHREY G., BANGARUSAMY D.K., WANG G., BRESSAN R.A., JENKS M.A., The *glossyhead1* allele of ACC1 reveals a principal role for multidomain acetyl-coenzyme A carboxylase in the bio- synthesis of cuticular waxes by Arabidopsis, **Plant Physiol**, v. 157, p. 1079–1092, 2011.
- LU X., VORA H., KHOSLA C., Overproduction of free fatty acids in E. coli: implications for biodiesel production, **Metab Eng**, 10:333–339, 2008.
- MAO J., CHIRALA S. S. & WAKIL, S. J., Human acetyl-CoA carboxylase 1 gene: presence of three promoters and heterogeneity at the 5'-untranslated mRNA region. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 13, p. 7515-7520, 2003.
- MARINI P. E., PEREZ C. A. & DE MENDOZA D., Growth-rate regulation of the *Bacillus subtilis* *accBC* operon encoding subunits of acetyl-CoA carboxylase, the first enzyme of fatty acid synthesis. **Archives of microbiology**, v. 175, n. 3, p. 234-237, 2001.
- MARTIN D.E. & REINHOLD-HUREK B., Distinct roles of PII-like signal transmitter proteins and *amtB* in regulation of *nif* gene expression, nitrogenase activity, and posttranslational modification of NifH in *Azoarcus* sp. strain BH72, **J Bacteriol**, v. 184, p. 2251–2259, 2002.
- MASCLAUX-DAUBRESSE C., DANIEL-VEDELE F., DECHORGNAT J., CHARDON F., GAUFICHON L., SUZUKI A., Nitrogen uptake, assimilation and remobilisation in plants: challenges for sustainable and productive agriculture, **Annals of Botany**, v. 105, p. 1141-1157, 2010.
- MACNEIL D., General method, using Mu-Mud1 dilysogens, to determine the direction of transcription of and generate deletions in the *glnA* region of *Escherichia coli*, **J Bacteriol**, v. 146, p. 260–268, 1981.
- MCGARRY J.D. & BROWN N.F., The mitochondrial carnitine palmitoyl transferase system: from concept to molecular analysis, **Eur. J. Biochem.**, v. 244, p. 1–14, 1997.
- MEADES, G., JR, BENSON, B.K., GROVE, A., AND WALDROP, G.L., A tale of two functions: enzymatic activity and translational repression by carboxyltransferase. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. 1217-1227, 2010.
- MEEK, T. D. & VILLAFRANCA, J. J., Kinetic mechanism of *Escherichia coli* glutamine synthetase, **Biochemistry**, v. 19, n. 24, p. 5513-5519, 1980.
- MERRICK M.J. & EDWARDS R.A., Nitrogen control in bacteria. **Microbiol Rev** 59: 604–622, 1995.
- MERRICK M., Post-translational modification of PII signal transduction proteins. **Front Microbiol** v. 5, p. 763, 2015.
- MOCHALKIN I., MILLER J. R., EVDOKIMOV A., LIGHTLE S., YAN C., STOVER C. K., WALDROP G. L., Structural evidence for substrate-induced synergism and half-sites reactivity in biotin carboxylase, **Protein Science**, v. 17, p. 1706-1718, 2008.
- MOURE V. R., RAZZERA G., ARAUJO L. M., OLIVEIRA M. A., GERHARDT E. C., MULLER-SANTOS M., *et al*, Heat stability of Proteobacterial PII protein facilitate purification using a single chromatography step. **Protein Expr Purif**, v. 81, p. 83– 88, 2012.
- MUEHLEBACH M., BOEGER M., CEDERBAUM F., CORNES D., FRIEDMANN A. A., GLOCK J., ... & WAGNER T., Aryldiones incorporating a [1, 4, 5] oxadiazepane ring. Part I: Discovery of the novel cereal herbicide pinoxaden. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 17, n. 12, p. 4241-4256, 2009.

MUNITA J. M., & ARIAS C. A., Mechanisms of antibiotic, 2016.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY, **Biodiesel handling and use guide**, 4^a edição, Springfield-USA, Office of Scientific and Technical Information, 2009.

NIKOLAU B.J., OHLROGGE J.B., WURTELE E.S., Plant biotin-containing carboxylases. **Arch Biochem Biophys**, v. 414, p. 211–222, 2003.

NINFA A. J. & ATKINSON M.R., PII signal transduction proteins, **Trends Microbiol**, v. 8, p. 172-179, 2000.

NUNES-NESI A, FERNIE AR & STITT M, Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions, **Mol Plant**, v.3, p. 973– 996, 2010.

OHLROGGE J., SAVAGE L., JAWORSKI J., VOELKER T. & POSTBEITTENMILLER, D., Alteration of acyl-acyl carrier protein pools and acetyl-CoA carboxylase expression in *Escherichia coli* by a plant medium-chain acyl-acyl carrier protein thioesterase. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 317, n. 1, p. 185-190, 1995.

PALANCA C. & RUBIO V., Effects of T-loop modification on the PII-signalling protein: structure of uridylylated *Escherichia coli* GlnB bound to ATP, **Environmental Microbiology Reports**, v. 9, n. 3, p. 290–299, 2017.

PARSONS J.B. & ROCK C. O., Bacterial lipids: metabolism and membrane homeostasis. **Progress in lipid research**, v. 52, n. 3, p. 249-276, 2013.

PASTORE A., & TEMUSSI P., Protein aggregation and misfolding: good or evil?, **J. Phys.: Condens. Matter**, v. 24, p. 244101, 2012.

PÉGORIER J., LE M. & GIRARD J., Control of gene expression by fatty acids. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 9, p. 2444S-2449S, 2004.

PETERSEN, C. & MOLLER, L. B., Invariance of the nucleoside triphosphate pools of *Escherichia coli* with growth rate, **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 3931-3935, 2000.

PETIT C., BAY G., PERNIN F., & DELYE, C, Prevalence of cross-or multiple resistance to the acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors fenoxaprop, clodinafop and pinoxaden in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) in France. **Pest management science**, v. 66, n. 2, p. 168-177, 2010.

POLYAK S. W., ABELL A. D., WILCE M. C. J., ZHANG L. & BOOKER G. W., Structure, function and selective inhibition of bacterial acetyl-CoA carboxylase, **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 93, p.983–992, 2012.

POLYAK, S. W., ABELL, A. D., WILCE, M. C. J., ZHANG, L., & BOOKER, G. W., Structure, function and selective inhibition of bacterial acetyl-coa carboxylase. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 983-992, 2012.

PORTUGAL M. E., SOUZA E. M., PEDROSA F. O. & BENELLI E. M. *Streptococcus* mutans GlnK protein: an unusual PII family member, **Braz J Med Biol Res**, v. 44, p. 394–401, 2011.

RABINOWITZ J.D. & SILHAVY T.J., Systems biology: Metabolite turns master regulator, **Nature**, v. 500, n. (7462), p. 283–284, 2013.

RADCHENKO M. V., THORNTON J., MERRICK M., Control of AmtB-GlnK complex formation by intracellular levels of ATP, ADP and 2-oxoglutarate, **J. Biol. Chem.** v. 285, p. 31037-31045, 2010.

RAHMAN Z., RASHID N, NAWAB J., ILYAS J., SUNG B. H., KIM S. C., *Escherichia coli* as a fatty acid and biodiesel factory: current challenges and future directions, **Environ Sci Pollut Res**, v. 23, p. 12007–12018, 2016.

- RAJENDRAN C, GERHARDT ECM, BJELIC S, GASPERINA A, SCARDUELLI M, PEDROSA FO, CHUBATSU LS, MERRICK M, SOUZA EM, WINKLER FK et al., Crystal structure of the GlnZ-DraG complex reveals a different form of PII-target interaction, **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 108, p. 18972–18976, 2011.
- RAMSAY R.R., GANDOUR R.D., VAN DER LEIJ F.R., Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. **Biochim Biophys Acta**, v. 1546, p. 21–43, 2001.
- RAY, H., MOREAU, K., DIZIN, E., CALLEBAUT, I., & DALLA VENEZIA, N, ACCA phosphopeptide recognition by the BRCT repeats of BRCA1. **Journal of molecular biology**, v. 359, n. 4, p. 973-982, 2006.
- RAY, H., SUAUF, F., VINCENT, A., & DALLA VENEZIA, N., Cell cycle regulation of the BRCA1/acetyl-CoA-carboxylase complex. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 378, n. 3, p. 615-619, 2009.
- REAVEN, GM, Insulin resistance: the link between obesity and cardiovascular disease. **Medical Clinics of North America**, v. 95, n. 5, p. 875-892, 2011.
- REDDY, M. C., BREDI, A., BRUNING, J. B., SHEREKAR, M., VALLURU, S., THURMAN, C., ... & SACCHETTINI, J. C, Structure, activity, and inhibition of the Carboxyltransferase β -subunit of acetyl coenzyme A carboxylase (AccD6) from *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 10, p. 6122-6132, 2014.
- REITZER L, Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. **Annu Rev Microbiol** 57: 155–176, 2003.
- REYES-RAMIREZ F., LITTLE R., DIXON R., Role of *Escherichia coli* nitrogen regulatory genes in the nitrogen response of the *Azotobacter vinelandii* NifL-NifA complex. **J Bacteriol**, v.183, p. 3076–3082, 2001.
- ROBERTS, E. L., SHU, N., HOWARD, M. J., BROADHURST, R. W., CHAPMAN-SMITH, A., WALLACE, J. C., MORRIS, T., CRONAN JR, J. E. e PERHAM, R. N., Solution structures of apo and holo-biotinyl domains from acetyl-coenzyme A carboxylase of *Escherichia coli* determined by triple-resonance nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Biochemistry** v. 38, p. 5045-5053, 1999.
- RODRIGUES T. E., GERHARDT E. C., OLIVEIRA M. A., CHUBATSU L. S., PEDROSA F. O., SOUZA E. M., SOUZA G. A., MÜLLER-SANTOS M., HUERGO L. F., Search for novel targets of the PII signal transduction protein in Bacteria identifies the BCCP component of acetyl-CoA carboxylase as a PII binding partner., **Mol. microbial.**, v. 91, n. 4, p. 751–761, 2014.
- RODRIGUES, T. E., SOUZA, V. E.P., MONTEIRO, R. A., GERHARDT, E. C.M., ARAÚJO, L. M., CHUBATSU, L. S., SOUZA, E. M., PEDROSA, F. O., HUERGO, L. F., In vitro interaction between the ammonium transport protein AmtB and partially uridylylated forms of the PII protein GlnZ, **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1814, p. 1203–1209, 2011.
- RUDNICK, P.A., ARCONDÉGUY, T., KENNEDY, C.K. & KAHN, D., *glnD* and *mviN* are genes of an essential operon in *Sinorhizobium meliloti*, **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 2682–2685, 2001.
- RUPILIUS W., AHMAD S., The changing world of oleochemicals, **Palm Oil Dev**, v. 44, p. 15–28, 2006.
- RUPPERT U, IRMLER A, KLOFT N & FORCHHAMMER, The novel protein phosphatase PphA from *Synechocystis* PCC 6803 controls dephosphorylation of the signalling protein PII. **Mol Microbiol**, v. 44, p. 855–864, 2002.
- SALIE M.J & THELEN J.J., Regulation and structure of the heteromeric acetyl-CoA carboxylase, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1861, p. 1207–1213, 2016.
- SAMBROOK J., FRITSCH E. F., MANIATIS T., **Molecular cloning a laboratory manual**. 2 ed. New York.

Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANT'ANNA F. H., TRENTINI D. B., DE SOUTO W. S., CECAGNO R., DA SILVA S. C. & SCHRANK I. S., The PII superfamily revised: a novel group and evolutionary insights, **J Mol Evol**, v. 68, p. 322–336, 2009.

SCARABEL, L., PANOZZO, S., VAROTTO, S., & SATTIN, M., Allelic variation of the ACCase gene and response to ACCase-inhibiting herbicides in pinoxaden-resistant *Lolium spp.* **Pest management science**, v. 67, n. 8, p. 932-941, 2011.

SEVERI, E., JAVELLE, A., & MERRICK, M., The conserved carboxy-terminal region of the ammonia channel AmtB plays a critical role in channel function. **Molecular membrane biology**, v. 24, n. 2, p. 161-171, 2006.

SCHULLER, D. J., GRANT, G.A. & BANASZAK L.J., The allosteric ligand site in the V_{\max} type cooperative enzyme phosphoglycerate dehydrogenase, **Nat. Struct. Biol**, v. 2, p. 69–76, 1995.

SCHUMACHER J., BEHREND S. V., PAN Z., BROWN D.R., HEYDENREICH F., LEWIS M.R., *et al.*, Nitrogen and carbon status are integrated at the transcriptional level by the nitrogen regulator NtrC *in vivo*. **mBio**, v. 4, e. 0088, p. 1-13, 2013.

SHAPIRO B.M., The glutamine synthetase deadenylylating enzyme system from *Escherichia coli*. Resolution into two components, specific nucleotide stimulation, and cofactor requirements. **Biochemistry**, v. 8, p. 659–670, 1969.

SHARKEY, M. A., & ENGEL, P. C., Apparent negative co-operativity and substrate inhibition in overexpressed glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*, **FEMS microbiology letters**, v. 281, n. 2, p. 132-139, 2008.

SHEN Y., VOLRATH S. L., WEATHERLY S. C., ELICH T. D., TONG L., A mechanism for the potent inhibition of eukaryotic acetyl-coenzyme A carboxylase by soraphen A, a macrocyclic polyketide natural product. **Mol Cell**, v. 16, p. 881–891, 2004.

SILVERS, M. A., PAKHOMOVA, S., NEAU, D. B., SILVERS, W. C., ANZALONE, N., TAYLOR, C. M., & WALDROP, G. L., Crystal Structure of Carboxyltransferase from *Staphylococcus aureus* Bound to the Antibacterial Agent Moiramide B., **Biochemistry**, v. 55, n.33, p. 4666-4674, 2016.

SMITH C. S., WELJIE A. M. & MOORHEAD G. B., Molecular properties of the putative nitrogen sensor PII from *Arabidopsis thaliana*, **Plant J** 33: 353–360, 2003.

SMITH A.C. & CRONAN J.E., Evidence against Translational Repression by the Carboxyltransferase Component of *Escherichia coli* Acetyl-CoA Carboxylase, **J. Bacteriol.**, v. 196, n. 21, p. 3768-3775, 2014.

SOLBIATI J., CHAPMAN-SMITH A., CRONAN J.E JR, Stabilization of the biotinoyl domain of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase by interactions between the attached biotin and the protruding “thumb” structure. **J. Biol Chem**, v. 277, p. 21604–21609, 2002.

SORIANO A., RADICE A. D., HERBITTER A. H., LANGSDORF E. F., STAFFORD J. M., CHAN S., *et al.*, *Escherichia coli* acetyl-coenzyme A carboxylase: characterization and development of a high-throughput assay, **Anal Biochem**, v. 349, p. 268–276, 2006.

SQUIRES, C. L., & ZAPOROJETS, D., Proteins shared by the transcription and translation machines. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 775-798, 2000.

STEEN E.J., KANG Y., BOKINSKY G., HU Z., SCHIRMER A., MCCLURE A., DEL CARDAYRE S. B., KEASLING J. D., Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass, **Nature**, v. 463, p. 559–562, 2010.

- STITT M., MÜLLER C., MATT P., GIBON Y., CARILLO P., MORCUENDE R., SCHEIBLE W. R. & KRAPP A. J., Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism, **Exp. Bot.**, v. 53, p. 959–970, 2002.
- STROSSER J., LUDKE A., SCHAFFER S., KRAMER R. & BURKOVSKI A., Regulation of GlnK activity: modification, membrane sequestration and proteolysis as regulatory principles in the network of nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum*. **Mol Microbiol**, v. 54, p. 132–147, 2004.
- THODEN, J. B., BLANCHARD, C. Z., HOLDEN, H. M., e WALDROP, G. L., Movement of the biotin carboxylase B-domain as a result of ATP binding, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 16183–16190, 2000.
- THOMAS G, COUTTS G & MERRICK M, The *glnKamtB* operon: a conserved gene pair in prokaryotes. **Trends Genet**, v. 16, p. 11–14, 2000.
- TONG L., Structure and function of biotin-dependent carboxylases, **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 70, p. 863–891, 2013.
- TONG, L., Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery, **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, p. 1784–1803, 2005.
- TRAN T. H, HSIAO Y. S., JO J., CHOU C. Y., DIETRICH L. E. P., WALZ T. & TONG L., Structure and function of a single-chain, multi-domain long-chain acyl-CoA carboxylase, **nature**, 2014.
- TRUAN, D.; HUERGO, L. F.; CHUBATSU, L. S.; MERRICK, M.; LI, X. D.; WINKLER, F. K., The new PII protein structure identifies the 2-oxoglutarate binding site, **J. Mol. Biol.** v. 400, p. 531–539, 2010.
- TSAY J. T, OH W., LARSON T.J., JACKOWSKI S., ROCK C.O., Isolation and characterization of the beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III gene (*fabH*) from *Escherichia coli* K-12. **J Biol Chem**, v. 267, p. 6807–6814, 1992.
- VAN HEESWIJK W.C., HOVING S., MOLENAAR D., STEGEMAN B., KAHN D. & WESTERHOFF H.V., An alternative PII protein in the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, v. 21, p. 133–146, 1996.
- VAN HEESWIJK W.C., WEN D., CLANCY P., JAGGI R., OLLIS D.L., WESTERHOFF H.V. & VASUDEVAN S.G., The *Escherichia coli* signal transducers PII (GlnB) and GlnK form heterotrimers in vivo: fine tuning the nitrogen signal cascade, **P Natl Acad Sci USA**, v. 97, p. 3942–3947, 2000.
- VAN HEESWIJK, W. C., RABENBERG, M., WESTERHOFF, H. V., KAHN, D., The genes of the glutamine synthetase adenylation cascade are not regulated by nitrogen in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 9, p. 443–457, 1993.
- VAN HEESWIJK W.C. WESTERHOFF H.V., BOOGERD F.C., Nitrogen assimilation in *Escherichia coli*: putting molecular data into a systems perspective. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 4, p. 628–695, 2013.
- VERONESE, F. M., BOCCU, E., & CONVENTI, L., Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: induction, purification and properties of the enzyme, **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology**, v. 377, n. 2, p. 217–228, 1975.
- VOELKER T. A., & DAVIES, H. M., Alteration of the specificity and regulation of fatty acid synthesis of *Escherichia coli* by expression of a plant medium-chain acyl-acyl carrier protein thioesterase. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 23, p. 7320–7327, 1994.
- WAKIL S. J. & ABU-ELHEIGA L. A., Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome, **Journal of Lipid Research**, p. 138–143, 2009.
- CRONAN JR, J. E. & WALDROP, G. L., Multi-Subunit Acetyl-CoA Carboxylases, **Progress in Lipid**

Research, n. 41, p. 407–435, 2002.

WALDROP G.L., HOLDEN, H.M & MAURICE M.S., The enzymes of biotin dependent CO₂ metabolism: What structures reveal about their reaction mechanisms, **Prot. Scie.**, v. 21, p. 1597-1619, 2012.

WALDROP, G. L., RAYMENT, I. e HOLDEN, H. M., Three-dimensional structure of the biotin carboxylase subunit of acetyl-CoA carboxylase. **Biochemistry**, v. 33, p. 10249-10256, 1994.

WANG, H. & CRONAN, J.E., Functional replacement of the FabA and FabB proteins of *Escherichia coli* fatty acid synthesis by *Enterococcus faecalis* FabZ and FabF homologues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 33, p. 34489-34495, 2004.

WEAVER L.H., KWON K., BECKETT D., MATTHEWS B.W., Corepressor-induced organization and assembly of the biotin repressor: a model for allosteric activation of a transcriptional regulator, **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, p. 6045–6050, 2001.

WEI J. & TONG L., Crystal structure of the 500 kD yeast acetyl-CoA carboxylase holoenzyme dimer. **Nature**, v. 526, n. 7575, p. 723, 2015.

WILSON K. P., SHEWCHUK L. M., BRENNAN R. G., OTSUKA A. J., MATTHEWS B. W., *Escherichia coli* biotin holoenzyme synthetase/bio repressor crystal structure delineates the biotin- and DNA binding domains. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 89, p. 9257–9261, 1992.

WITKOWSKI A., THWEATT J., SMITH S., Mammalian ACSF3 protein is a malonyl-CoA synthetase that supplies the chain extender units for mitochondrial fatty acid synthesis. **J Biol Chem**, v. 286, p. 33729–33736, 2011.

WOOD Z.A., WEAVER L.H., BROWN P.H., BECKETT D., MATTHEWS B.W., Co-repressor induced order and biotin repressor dimerization: a case for divergent followed by convergent evolution, **J Mol Biol**, v. 357, p. 509–523, 2006.

XEGINTON C., CRESSMAN W.J., BACHAS S., WADE H. & BECKETT D., Allosteric Coupling via Distant Disorder-to-Order Transitions, **J Mol Biol**, v. 427, p. 1695–1704, 2015.

XU Y., CHEAH P., CARR P. D., van HEESWIJK W. C., WESTERHOFF H. V., VASUDEVAN S. G., OLLIS D. L., GlnK, a PII-homologue: Structure reveals ATP binding site and indicates how the T-loop may be involved in molecular recognition, **jbm**, v. 282, p. 149-165, 1998.

XU Y., CARR P. D., VASUDEVAN S. G. & OLLIS D. L., Structure of the adenylation domain of *E. coli* glutamine synthetase adenylyl transferase: evidence for gene duplication and evolution of a new active site, **J Mol Biol**, v. 396, p. 773–784, 2010.

YAN D., LENZ P. & HWA T., Overcoming fluctuation and leakage problems in the quantification of intracellular 2-oxoglutarate levels in *Escherichia coli*, **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 77, p. 6763–6771, 2011.

YANG X., GUSCHINA, I. A., HURST, S., WOOD, S., LANGFORD, M., HAWKES, T., & HARWOOD, J. L., The action of herbicides on fatty acid biosynthesis and elongation in barley and cucumber. **Pest management science**, v. 66, n. 7, p. 794-800, 2010.

YAO J. & ROCK C., O. Exogenous fatty acid metabolism in bacteria. **Biochimie**, 2017.

YAO X., WEI D., SODEN C. JR, SUMMERS M. F., BECKETT D., Structure of the carboxy-terminal fragment of the apo-biotin carboxyl carrier subunit of *Escherichia coli* acetyl- CoA carboxylase, **Biochemistry**, v. 36, p. 15089-15100, 1997.

YAO Z., DAVIS R. M., KISHONY R., KAHNE D., & RUIZ N., Regulation of cell size in response to nutrient availability by fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli* pans, v. 109, n. 38, p. E2561–E2568, 2012.

- YOU C., OKANO H., HUI S., ZHANG Z., KIM M., GUNDERSON, C. W., WANG, Y. P., LENS, P., YAN, D. E HWA, T., Coordination of bacterial proteome with metabolism by cyclic AMP signalling. **Nature**, v. 500, p. 301-306, 2013.
- YU, Q., COLLAVO, A., ZHENG, M. Q., OWEN, M., SATTIN, M., & POWLES, S. B., Diversity of acetyl-coenzyme A carboxylase mutations in resistant *Lolium* populations: evaluation using clethodim. **Plant Physiology**, v. 145, n. 2, p. 547-558, 2007.
- YUAN, J., DOUCETTE, C.D., FOWLER, W.U., FENG, X.J., PIAZZA, M., RABITZ, H.A., WINGREEN, N.S. AND RABINOWITZ, J.D., Metabolomics-driven quantitative analysis of ammonia assimilation in *E. coli*. **Molecular systems biology**, v. 5, n. 1, p.302, 2009.
- YÜKSEL e YÜKSEL, The use of ethanol–gasoline blend as a fuel in an SI engine, **Renewable Energy**, v. 29, p. 1181–1191, 2004.
- YURGEL S. N. & KAHN M. L., A mutant GlnD nitrogen sensor protein leads to a nitrogen-fixing but ineffective *Sinorhizobium meliloti* symbiosis with alfalfa. **P Natl Acad Sci USA**, v. 105, p. 18958–18963, 2008.
- VINCENTZ M., MOUREAUX T., LEYDECKER M. T., VAUCHERET H., & CABOCHE M., Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites, **Plant J.**, v. 3, p. 313–324, 1993.
- XIAO, X., YU, X. e KHOSLA, C., Metablix flux between unsaturated and saturated fatty acids is controlled by the FabA:FabB ratio in the fully reconstituted fatty acid biosynthetic pathway of *Escherichia coli*, **biochemistry**, v. 52, p. 8304-8312, 2013.
- ZALUTSKAYA Z., KHARATYAN N., FORCHHAMMER K., & ERMILOVA E., Reduction of PII signaling protein enhances lipid body production in *chlamydomonas reinhardtii*. **plant sci.** v. 240, p. 1–9, 2015
- ZHA W., RUBIN-PITEL S. B., SHAO Z., ZHAO H., Improving cellular malonyl-CoA level in *Escherichia coli* via metabolic engineering, v. 11, p. 192–198 , 2009.
- ZHANG B, & YE B.C., A single fluorescent protein-based sensor for in vivo 2-oxoglutarate detection in cell **Biosensors and Bioelectronics**, v. 54, p. 15–19, 2014.
- ZHANG Y, POHLMANN EL, HALBLEIB CM, LUDDEN PW & ROBERTS GP, Effect of PII and its homolog GlnK on reversible ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase by heterologous expression of the *Rhodospirillum rubrum* dinitrogenase reductase ADP-ribosyl transferase-dinitrogenase reductase- activating glycohydrolase regulatory system in *Klebsiella pneumoniae*. **J Bacteriol**, v. 183, p. 1610–1620, 2001.
- ZHANG Y, PU H, WANG Q, CHENG S, ZHAO W, ZHANG Y & ZHAO J, PII is important in regulation of nitrogen metabolism but not required for heterocyst formation in the cyanobacterium *Anabaena sp.* PCC 7120. **J Biol Chem** v. 282, p. 33641–33648, 2007.
- ZHANG, Y., POHLMANN, E.L., SERATE, J., CONRAD, M.C, AND ROBERTS, G.P., Mutagenesis and functional characterization of the four domains of GlnD, a bifunctional nitrogen sensor protein, **J Bacteriol**, v. 192, p. 2711–2721, 2010.
- ZHENG Y., LI L., LIU Q., WEN QIN W., YANG J., CAO Y., JIANG X., ZHAO G. & XIAN M., Boosting the free fatty acid synthesis of *Escherichia coli* by expression of a cytosolic *Acinetobacter baylyi* thioesterase, **Biotechnol. Biofuels**, v. 5, p. 76, 2012.

ANEXO 1 – DADOS COMPLEMENTARES

1 MNTLP ^Q E ^Q YAN e e e e e e e b e e	11 TAL ^P PTL ^P G ^Q Q ^P e b e e e b e e e e	21 QN ^P PCVW ^P RDE e e e e e b e e e e	31 LTVGGIK ^A HAHI e e b e e b e e e b	41 DTFQRWL ^G DA e e b e e e b e e e
51 FDNGISAE ^Q L b e e e e e b e e b	61 IEARTE ^F ID ^Q b e e e b e b b e e f f	71 LLQRLWIEAG b b e e b b e e b e	81 FSQIADLALV e e e e e e b b b b s	91 AVGGYGRGEL b b b b b b e e e b s s s s s s f f s
101 HPLSDIDLLI b e e b e b e b b b f s f f	111 LSRKKLPDD ^Q b b e e e e e e e e	121 AQKVGE ^L LLT ^L e e e b e e b b e b	131 LWDVKLE ^V G ^H b b e b e b e b e b s f f	141 SVRTLEECML b b e b b e e b e e s s f
151 EGLSDLT ^V AT e b e e e b e b b b f f s	161 NLIESRL ^L IG e b b e b b b b e e f f s f	171 DVALFLELQK e e e b b e e b e e	181 HIFSEGF ^W PS e b e e e e b b e e	191 DKFYAAK ^V EE e e b b e b e e e e s s f f
201 QNQRHQR ^Y HG f e e e e e e e e e f f	211 TSYNLEPDIK e e e e b e e e b e f f f s f f f f	221 SSPGGLRDIH e e e e e b e e b b f f f f s f f	231 TLQWVAR ^R HF b b b b b b e e e b s f	241 GATSLDE ^M VG e e e e b e e b b e
251 FGFLTSAERA e e b b e e e e b e f	261 ELNECLHIL ^W e b e e b e e b b e s	271 RIRFALHLV ^V e b b b e b b b b b s s s	281 SRYDNRL ^L FD e e e e e e b b b e f f f f s f	291 RQLSVAQR ^L N b e e e b b e e b e f s f
301 YSGEGNEP ^V E b e e e e e e b b e	311 RMMKDYFR ^V T e b b e e b b e b b	321 RRVSELN ^Q ML e e b e e b b e b b	331 LQLFDEA ^I LA b e b b e e e b e e	341 LPADEKPR ^P I e e e e e e e e b
351 DDEFQLR ^G TL e e e b e e e e e b f s	361 IDL ^R DET ^L FM b e b e e e e b b e	371 RQPEAIL ^R MF e e e e b b b e b b f s	381 YTMVRNSA ^I T b b b e e e e e b e	391 GIYSTTL ^R QL e b e b e b b b b b s f
401 RHARRHL ^Q QP e e b e e e b e e e f	411 LCNIPEAR ^K L b e e e e e b e e b f	421 FLSILRH ^P GA b b e b b e e e e e s	431 VRRGLLP ^M HR b e e b b e e b e e f s f	441 HSVLGAY ^M PQ b b b b b e b b e e s s f
451 WSHIVGQM ^Q F b e e b b b e b b e s s s f s s f	461 DLFHAYTV ^D E b b b b b b b b e e s s s s s s s f f	471 HTIRVML ^K LE b b b e b b e e b e s s f	481 SFASEETR ^Q R e b e e e e e e e e	491 HPLCVDV ^W PR b e b b b e b b e e f
501 LPSTELIF ^I A b e e e e b b b b b f s	511 ALFHDI ^A KGR b b b b e b b e e e s f s f f f	521 GGDHSIL ^G AQ e e e e b e b b e e f f f s s	531 DVVHFAEL ^H G e b e e b b e e e e s f	541 LNSRETQ ^L VA b e e e e e e b b e f
551 WLV ^R QHLLMS b b b e e b b b b b s s s s s s s	561 VTAQR ^R DIQD b e e e e e e e e e f f f f f f f	571 PEVIKQ ^F AEE e e b b e e b b e e f s s	581 VQTENR ^L RYL b e e e e e b e b b s s	591 VCLTVAD ^I CA b b b b b b b b e e s s s s s f f



Figura complementar 1- Análise da sequência de aminoácidos de GlnD de *E. coli*. Nível de conservação de aminoácidos determinado por alinhamento múltiplo de sequência (MAFFT) e predição funcional de aminoácidos por algoritmo ConSurf. Escala crescente de conservação de aminoácido: 1 2 3 4 5 6 7 8 9. e – Resíduo exposto. b – Resíduo oculto. f – Resíduo funcionalmente importante (altamente conservado e exposto). s – Resíduo estruturalmente importante (altamente conservado e oculto). x – Dados insuficientes.

```

1...10...20...30...40...50...60...70...80...90...100
MNTLPEQYANTALPTLPQGPQNPVCWPRDELTVGGIKAHIDTFQRWLGDAFDNGISAEQLIEARTEFIDQLLQRLWIEAGFSQIADLALVAVGGYGRGEL
...110...120...130...140...150...160...170...180...190...200
HPLSDIDLILSRKKLPDDQAKVGGELLTLLWDVKLEVGHVSRTLEECMLEGLSDLTATNLIESRLLIGDVALFLELQKHIFSEGFWPSDKFYAAKVEE
...210...220...230...240...250...260...270...280...290...300
QNQRHQRYHGTSYNLEPDIKSSPGGLRDIHTLQWVARHFGATSLDEMVGFGFLTSAERAELNECLHILWRIRFALHLVVSRYDNRLLFDRQLSVAQRLN
...310...320...330...340...350...360...370...380...390...400
YSGEGNEPVERMMKDYFRVTRRVSELNQMLLQLFDEAILALPADEKPRPIDDEFQLRGTLIDLRDETLMRQPEAILRMFYTMVRNSAITGIYSTTLRQL
...410...420...430...440...450...460...470...480...490...500
RHARRHLQQLCNIPEARKFLSILRHGPAVRRGLLPMHRHSVLGAYMPQWSHIVGQMQLDFHAYTVDEHTIRVMLKLESFASETQRHPLCVDVWPR
...510...520...530...540...550...560...570...580...590...600
LPSRELIFIAALFHDIAKGRGGHSLGAQDVVHFAELHGLNSRETQLVAVLVRQHLLMSVTAQRDIQDPEVIKQFAEEVQTENRLRYLVCLTVAIDICA
...610...620...630...640...650...660...670...680...690...700
TNETLWNSWKQSLLELYFATEKQLRGMQNTPDMRERVRHHQLQALALLRMDNIDEALHQIWSRCRANYFVRHSPNQLAWHARHLLQHDLSKPLVLLS
...710...720...730...740...750...760...770...780...790...800
PQATRGTEIFWSPDRPYLFAAVCAELDRNLSVHDAQIFTTRDGMAMDTFIVLEPDGSPLSADRHEVIRFGLEQVLTQSSWQPPQPRRQPAKLHFTV
...810...820...830...840...850...860...870...880...890
ETEVTFPLPTHDRKSFLELIALDQPGLLARVKGIFADLGISLHGARITTI GERVEDLFIIATADRRALN NELQQEVHQRLTEALNPNDKG

```

Legenda	Algoritmo
LOOP	Estrutura secundária em <i>loop</i>
HÉLICE	Estrutura secundária em hélice
CADEIA BETA	Estrutura secundária em cadeia-β
DESORDENADO	Região desordenada
BAIXA COMPLEXIDADE	Região de baixa complexidade

Figura complementar 2- Sequencia da GlnD de *E. coli* e predição de estrutura secundária. Análise realizada no XtalPrep-RF.

```

1...10...20...30...40...50...60...70...80...90...100
MDIRKIKKLIELVEESGISELEISEGESVRISRAAPAAFFPVMQQAAYAAPMMQQAQSNAAAPATVPSMEAPAAEISGHIVRSPMVGTFYRTSPDAK
...110...120...130...140...150...
AFIEVGQKVNVDGTLTLCIVEAMKMMNQIEADKSGTVKAILVESGPVEFDEPLVIE

```

Legenda	Algoritmo
LOOP	Estrutura secundária em <i>loop</i>
HÉLICE	Estrutura secundária em hélice
CADEIA BETA	Estrutura secundária em cadeia-β
DESORDENADO	Região desordenada
BAIXA COMPLEXIDADE	Região de baixa complexidade

Figura complementar 3- Sequencia de BCCP de *E. coli* e predição de estrutura secundária. Análise realizada no XtalPrep-RF.

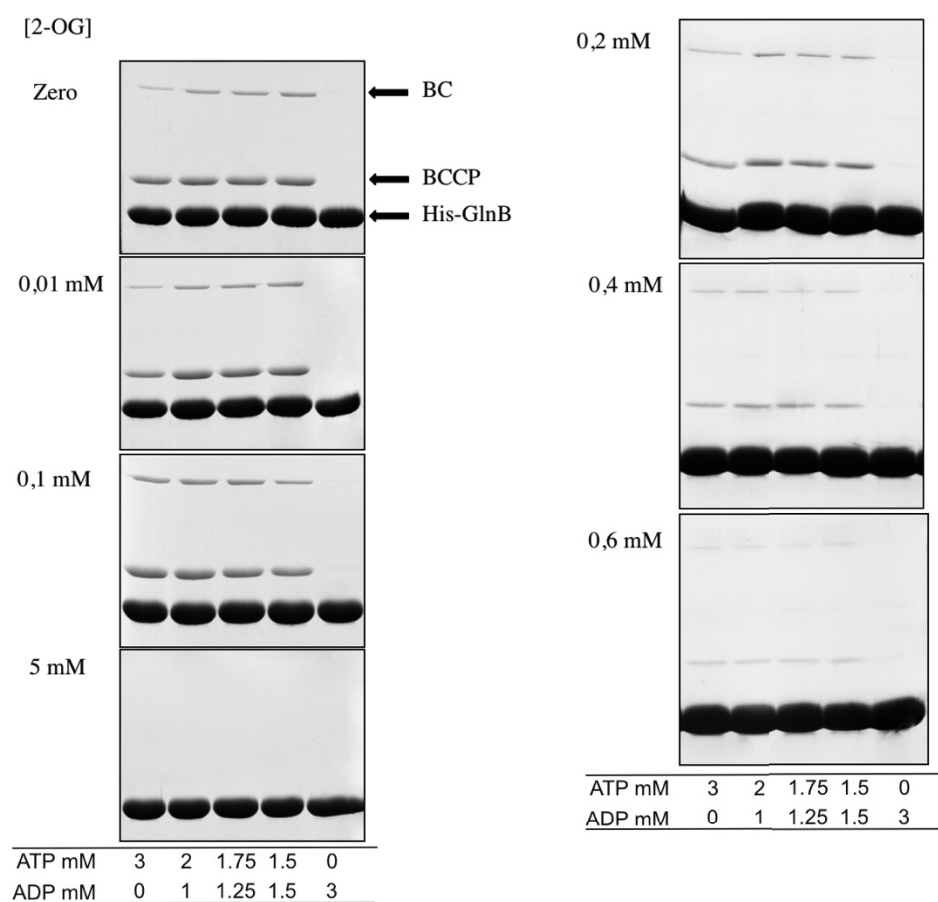


Figura complementar 4 – **Efeito da taxa ATP/ADP na interação HisGlnB-BCCP-BC em *E. coli*.** Ensaio de *pull down* em concentrações de 0-5mM de 2-OG e sob concentrações de ATP/ADP conforme indicado. HisGlnB (5µg) imobilizada em resina magnética de níquel (5µL) (Promega) pré-lavada com 100 µL de tampão de interação (Tris-HCl pH 8 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, imidazol 20 mM, LDAO 0,1% (m/v), glicerol 10%) incubada com BCCP (10µg) e BC (15µg) nativas. Após 3 lavagens com 300 µL de tampão de interação a eluição foi realizada com tampão de interação acrescido de 500 mM de Imidazol e todo o volume eluído (15µL) foi submetido à SDS-PAGE e corado com Coomassie blue.

Tabela complementar 1 – Composições das soluções kit PEG/Ion (Hampton Reaserch)

n	[]	u	Sal			Precipitante	pH	N ref.	Cond	
1	0,2	M	Fluoreto de sódio	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	7,3	1,36145	8,8	mS/cm
2	0,2	M	Fluoreto de potássio	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	7,2	1,36154	10,8	mS/cm
3	0,2	M	Fluoreto de amônio	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,2	1,36162	10,5	mS/cm
4	0,2	M	Cloreto de lítio	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,8	1,36228	10,0	mS/cm
5	0,2	M	Cloreto de magnésio hexahidratado	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	5,9	1,36516	17,3	mS/cm
6	0,2	M	Cloreto de sódio	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,9	1,36241	13,1	mS/cm
7	0,2	M	Cloreto de cálcio dihidratado	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	5,1	1,36597	18,8	mS/cm
8	0,2	M	Cloreto de potássio	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,9	1,36242	13,2	mS/cm
9	0,2	M	Cloreto de amônio	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,2	1,36253	13,6	mS/cm
10	0,2	M	Iodeto de sódio	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,9	1,36470	11,0	mS/cm
11	0,2	M	Iodeto de potássio	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	7,0	1,36548	12,6	mS/cm
12	0,2	M	Iodeto de amônio	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	5,9	1,36482	13,3	mS/cm
13	0,2	M	Triocianeto de sódio	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,8	1,36376	9,9	mS/cm
14	0,2	M	Triocianeto de potássio	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,9	1,36373	11,5	mS/cm
15	0,2	M	Nitrato de lítio	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	7,0	1,36198	9,7	mS/cm
16	0,2	M	Nitrato de magnésio hexahidratado	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	5,8	1,36473	16,9	mS/cm
17	0,2	M	Nitrato de sódio	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,8	1,36216	10,8	mS/cm
18	0,2	M	Nitrato de potássio	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,7	1,36207	12,1	mS/cm
19	0,2	M	Nitrato de amônio	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,3	1,36275	13,1	mS/cm
20	0,2	M	Formiato de magnésio dihidratado	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	7,0	1,36443	10,7	mS/cm
21	0,2	M	Formiato de sódio	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	7,2	1,36208	9,1	mS/cm
22	0,2	M	Formiato de potássio	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	7,2	1,36214	11,0	mS/cm
23	0,2	M	Formiato de amônio	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,6	1,36201	11,3	mS/cm
24	0,2	M	Acetato de lítio dihidratado	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	7,9	1,36264	6,0	mS/cm
25	0,2	M	Acetato de magnésio tetrahidratado	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	7,5	1,36564	7,9	mS/cm
26	0,2	M	Acetato de zinco dihidratado	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,3	1,36592	6,3	mS/cm
27	0,2	M	Acetato de sódio trihidratado	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	8,0	1,36290	8,0	mS/cm
28	0,2	M	Acetato de cálcio monohidratado	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	7,5	1,36564	7,5	mS/cm
29	0,2	M	Acetato de potássio	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	7,8	1,36252	8,0	mS/cm
30	0,2	M	Acetato de amônio	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	7,1	1,36277	7,1	mS/cm
31	0,2	M	Sulfato de lítio monohidratado	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	5,7	1,36449	5,9	mS/cm
32	0,2	M	Sulfato de magnésio heptahidratado	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	5,9	1,36506	5,9	mS/cm
33	0,2	M	Sulfato de sódio decahidratado	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,7	1,36435	6,6	mS/cm
34	0,2	M	Sulfato de potássio	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,7	1,36427	6,8	mS/cm
35	0,2	M	Sulfato de amônio	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,1	1,36446	6,0	mS/cm
36	0,2	M	Tartarato de sódio dibásico dihidratado	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	7,2	1,36651	7,2	mS/cm
37	0,2	M	Tartarato de sódio e potássio tetrahidratado	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	7,4	1,36664	7,3	mS/cm
38	0,2	M	Tartarato de amônio dibásico	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,5	1,36688	6,6	mS/cm
39	0,2	M	Fosfato de sódio monobásico monohidratado	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	4,7	1,36351	4,7	mS/cm
40	0,2	M	Fosfato de sódio dibásico dihidratado	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	9,2	1,36537	9,1	mS/cm
41	0,2	M	Fosfato de sódio monobásico	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	4,9	1,36414	4,8	mS/cm
42	0,2	M	Fosfato de sódio dibásico	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	9,2	1,36535	9,2	mS/cm
43	0,2	M	Fosfato de amônio monobásico	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	4,7	1,36344	4,6	mS/cm

44	0,2	M	Fosfato de amônio dibásico	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	8,0	1,36529	8,0	mS/cm
45	0,2	M	Citrato de lítio tribásico tetrahidratado	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	8,3	1,36866	8,4	mS/cm
46	0,2	M	Citrato de sódio tribásico dihidratado	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	8,2	1,36943	8,3	mS/cm
47	0,2	M	Citrato de potássio tribásico monohidratado	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	8,2	1,36908	8,6	mS/cm
48	0,2	M	Citrato de amônio dibásico	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	5,1	1,36792	5,1	mS/cm
n	[]	u	Sal/tampão			Precipitante	pH	N ref.	Cond	u
49	0,1	M	Malonato de sódio pH4	12	% p/v	Polietileno glicol 3,350	4,6	1,35106	5,7	mS/cm
50	0,2	M	Malonato de sódio pH4	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	4,6	1,36269	8,0	mS/cm
51	0,1	M	Malonato de sódio pH5	12	% p/v	Polietileno glicol 3,350	5,6	1,35178	8,0	mS/cm
52	0,2	M	Malonato de sódio pH5	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	5,6	1,36473	10,7	mS/cm
53	0,1	M	Malonato de sódio pH6	12	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,4	1,35212	9,8	mS/cm
54	0,2	M	Malonato de sódio pH6	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,5	1,36526	13,0	mS/cm
55	0,1	M	Malonato de sódio pH7	12	% p/v	Polietileno glicol 3,350	7,4	1,35208	9,1	mS/cm
56	0,2	M	Malonato de sódio pH7	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	7,4	1,36549	13,4	mS/cm
57	4	% v/v	Tacsimato pH4	12	% p/v	Polietileno glicol 3,350	4,4	1,35185	7,6	mS/cm
58	8	% v/v	Tacsimato pH4	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	4,5	1,36504	10,4	mS/cm
59	4	% v/v	Tacsimato pH5	12	% p/v	Polietileno glicol 3,350	5,4	1,35234	10,5	mS/cm
60	8	% v/v	Tacsimato pH5	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	5,4	1,36607	14,0	mS/cm
61	4	% v/v	Tacsimato pH6	12	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,3	1,35282	12,5	mS/cm
62	8	% v/v	Tacsimato pH6	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,3	1,36690	16,3	mS/cm
63	4	% v/v	Tacsimato pH7	12	% p/v	Polietileno glicol 3,350	7,2	1,35289	12,6	mS/cm
64	8	% v/v	Tacsimato pH7	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	7,2	1,36700	16,5	mS/cm
65	4	% v/v	Tacsimato pH8	12	% p/v	Polietileno glicol 3,350	7,7	1,35287	13,0	mS/cm
66	8	% v/v	Tacsimato pH8	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	7,8	1,36713	16,9	mS/cm
67	0,1	M	Succinato pH7	12	% p/v	Polietileno glicol 3,350	7,2	1,35224	9,9	mS/cm
68	0,2	M	Succinato pH7	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	7,3	1,36594	13,2	mS/cm
69	0,1	M	Citrato e amônio tribásico pH7	12	% p/v	Polietileno glicol 3,350	7,1	1,35410	15,1	mS/cm
70	0,2	M	Citrato e amônio tribásico pH7	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	7,1	1,36964	19,6	mS/cm
71	0,1	M	Malato DL pH7	12	% p/v	Polietileno glicol 3,350	7,1	1,35236	9,6	mS/cm
72	0,2	M	Malato DL pH7	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	7,1	1,36642	12,5	mS/cm
73	0,1	M	Acetato de sódio trihidratado pH7	12	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,8	1,35055	5,4	mS/cm
74	0,2	M	Acetato de sódio trihidratado pH7	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,9	1,36272	7,6	mS/cm
75	0,1	M	Formiato de sódio pH7	12	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,8	1,35022	6,4	mS/cm
76	0,2	M	Formiato de sódio pH7	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,9	1,36211	9,3	mS/cm
77	0,1	M	Tartarato de amônio dibásico pH7	12	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,8	1,35264	12,2	mS/cm
78	0,2	M	Tartarato de amônio dibásico pH7	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,8	1,36674	16,2	mS/cm
79	2/0,1	% v/v / M	Tacsimato pH4/acetato de sódio trihidratado	16	% p/v	Polietileno glicol 3,350	4,8	1,35729	8,6	mS/cm
80	2/0,1	% v/v / M	Tacsimato pH5/Citrato de sódio tribásico dihidratado	16	% p/v	Polietileno glicol 3,350	5,9	1,36083	13,7	mS/cm
81	2/0,1	% v/v / M	Tacsimato pH6/BIS-TRIS	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,6	1,36575	7,1	mS/cm
82	2/0,1	% v/v / M	Tacsimato pH7/HEPES	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	7,4	1,36611	6,0	mS/cm
83	2/0,1	% v/v / M	Tacsimato pH8/Tris	16	% p/v	Polietileno glicol 3,350	8,6	1,35872	7,7	mS/cm
84	0,07	M	Citrato	16	% p/v	Polietileno glicol 3,350	3,8	1,35817	1447, 3	mS/cm
85	0,06	M	Citrato	16	% p/v	Polietileno glicol 3,350	4,4	1,35850	1718, 3	mS/cm
86	0,05	M	Citrato	16	% p/v	Polietileno glicol 3,350	5,2	1,35892	1,9	mS/cm
87	0,04	M	Citrato	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,5	1,36470	1273, 0	mS/cm
88	0,03	M	Citrato	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	7,8	1,36484	1349, 3	mS/cm
89	0,02	M	Citrato	16	% p/v	Polietileno glicol 3,350	8,9	1,35939	1542, 0	mS/cm

90	0,02	M	Cloreto de cálcio dihidratado	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	5,4	1,36202	5,2	mS/cm
91	0,01	M	Cloreto de magnésio hexahidratado	15	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,8	1,35860	8,2	mS/cm
92	0,02	M	Cloreto de zinco	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	4,4	1,36094	2,3	mS/cm
93	0,15	M	Cloreto de céσιο	15	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,9	1,35552	12,3	mS/cm
94	0,2	M	Brometo de sódio	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,8	1,36318	11,5	mS/cm
95	1	% p/v	Triptona	12	% p/v	Polietileno glicol 3,350	6,9	1,35370	4,3	mS/cm
96	1	% p/v	Triptona	20	% p/v	Polietileno glicol 3,350	7,0	1,36455	3,3	mS/cm

ANEXO 2 – ARTIGO PUBLICADO

The Bacterial signal transduction protein GlnB regulates the committed step in fatty acid biosynthesis by acting as a dissociable regulatory subunit of acetyl-CoA carboxylase

Edileusa C.M. Gerhardt,^{1,2†} Thiago E. Rodrigues,^{1†} Marcelo Müller-Santos,¹ Fabio O. Pedrosa,¹ Emanuel M. Souza,¹ Karl Forchhammer^{2*} and Luciano F. Huergo^{1**}

¹Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia da Fixação Biológica de Nitrogênio, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, CEP 81531-990 CP 19046, Curitiba, PR, Brazil.

²Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin der Eberhard-Karls Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 28, Tübingen 72076, Germany.

Summary

Biosynthesis of fatty acids is one of the most fundamental biochemical pathways in nature. In bacteria and plant chloroplasts, the committed and rate-limiting step in fatty acid biosynthesis is catalyzed by a multi-subunit form of the acetyl-CoA carboxylase enzyme (ACC). This enzyme carboxylates acetyl-CoA to produce malonyl-CoA, which in turn acts as the building block for fatty acid elongation. In *Escherichia coli*, ACC is comprised of three functional modules: the biotin carboxylase (BC), the biotin carboxyl carrier protein (BCCP) and the carboxyl transferase (CT). Previous data showed that both bacterial and plant BCCP interact with signal transduction proteins belonging to the P_{II} family. Here we show that the GlnB paralogues of the P_{II} proteins from *E. coli* and *Azospirillum brasilense*, but not the GlnK paralogues, can specifically form a ternary complex with the BC-BCCP components of ACC. This interaction results in ACC inhibition by decreasing the enzyme turnover number. Both the BC-BCCP-GlnB interaction and ACC inhibition were relieved by 2-oxoglutarate and by GlnB uridylylation. We propose that the GlnB

protein acts as a 2-oxoglutarate-sensitive dissociable regulatory subunit of ACC in Bacteria.

Introduction

The committed and rate-limiting step in fatty acid biosynthesis is catalyzed by acetyl-CoA carboxylase (ACC). This enzyme carboxylates acetyl-CoA to produce malonyl-CoA, which in turn acts as the building block for fatty acid elongation. Two distinct types of ACC are found in nature. In mammals, fungi and in the cytosol of most plants, a single multifunctional polypeptide is responsible for the ACC activity. However, in most bacteria and in plant chloroplasts, the ACC enzyme is usually composed of multiple subunits (MS type ACC) (Cronan and Waldrop, 2002; Tong, 2013).

Typical MS-ACC is composed of four different polypeptides that assemble into three functional units: a homodimer of the biotin carboxylase (BC); the biotin carboxyl carrier protein (BCCP); and a heterotetramer $\alpha_2\beta_2$ of the carboxyltransferase (CT) (Fig. 1). The BC and BCCP units form a stable complex composed of two BC dimers bound to four BCCP monomers (Broussard *et al.*, 2013a). The holo ACC of *Escherichia coli* forms a large macromolecular complex whose final stoichiometry remains to be determined (Broussard *et al.*, 2013b). BC catalyzes the first half reaction, the ATP-dependent carboxylation of biotin, which is covalently attached to BCCP (Fig. 1). The second half reaction is catalyzed by CT, which transfers the carboxyl group from carboxybiotin to acetyl-CoA generating malonyl-CoA (Fig. 1) (Tong, 2013).

Despite the fundamental role played by MS-ACC in fatty acid biosynthesis in bacteria and plants, relatively little information is known about its mode of regulation. In *E. coli*, the CT component of the enzyme has been implicated in the regulation of both CT synthesis and activity. Under low acetyl-CoA levels, CT interacts with the mRNA that encodes its α and β subunits inhibiting the translation of this mRNA; the CT-mRNA interaction also reduces CT activity. Conversely, when acetyl-CoA levels are high, CT dissociates from the mRNA enhancing its enzymatic activity and allowing translation of the CT subunits (Meades *et al.*, 2010). However, this hypothesis has been recently

Accepted 14 December, 2014. For correspondence. *E-mail karl.forchhammer@uni-tuebingen.de; Tel. (+49) 7071 29 72096; Fax (+49) 7071 29 543. **E-mail huergo@ufpr.br; Tel. (+55) 41 33611570; Fax (+55) 41 33161570. †These authors contributed equally to this work. Classification: Biological Sciences, Biochemistry.

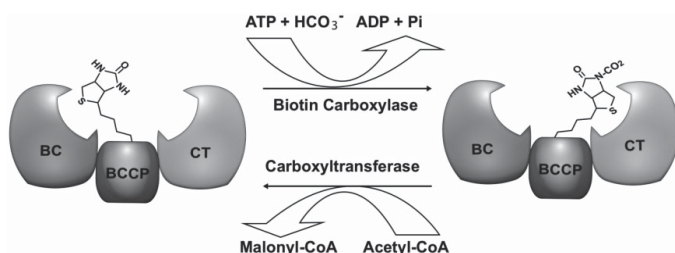


Fig. 1. Reaction catalyzed by the multi-subunit acetyl-CoA carboxylase.

challenged by Smith and Cronan (2014). The *E. coli* MS-ACC is also subject to feedback inhibition by acylated forms of the acyl carrier protein (acyl-ACP) (Davis and Cronan, 2001).

The P_{II} protein family comprises a large group of highly conserved signal transduction proteins that are present in Bacteria, Archaea and in the chloroplasts of plants (Forchhammer, 2008). P_{II} proteins are homotrimers that form a barrel-like structure where each subunit carries a solvent-exposed T-loop that is vital for P_{II} function (Huergo *et al.*, 2013). P_{II} proteins can bind ATP and ADP competitively to each of the three lateral clefts located between the subunits. When the sites are occupied by MgATP, they can bind in addition the TCA cycle intermediate 2-oxoglutarate (2-OG) (Jiang and Ninfa, 2007). The interaction between P_{II} and the small molecule effectors ATP, ADP and 2-OG affects the conformation of the T-loop and thereby, P_{II} interactions with targets (Ninfa and Jiang, 2005; Truan *et al.*, 2010). In Proteobacteria, P_{II} function is furthermore modulated by reversible uridylylation of the P_{II} T-loop. The glutamine-sensing bifunctional enzyme GlnD uridylylates P_{II} under low glutamine levels and removes the uridylyl group from P_{II} under high glutamine (Jiang *et al.*, 1998; Araujo *et al.*, 2008).

P_{II} proteins from different organisms can interact with a variety of different targets to orchestrate nitrogen assimilatory reactions. Specifically, P_{II} proteins may interact with transporters, key enzymes of nitrogen assimilation, transcription factors or proteins that control transcription factors (Forchhammer, 2008; Huergo *et al.*, 2013). In addition to these targets, the P_{II} protein from *Arabidopsis thaliana* (a nuclear-encoded P_{II} homologue) interacts with various soluble chloroplastic biotin-containing proteins (including BCCP paralogues) and inhibits chloroplast MS-ACC activity by about 50%. Both P_{II} interaction with biotin-containing proteins and MS-ACC inhibition are relieved in the presence of the P_{II} effector 2-OG, suggesting that the plant P_{II} protein is involved in the control of fatty acid metabolism (Feria Bourrellier *et al.*, 2010). However, no further biochemical studies have been performed nor has the interaction with various subunits of MC-ACC been studied in detail.

We have recently identified interaction between the P_{II} protein GlnZ from *Azospirillum brasilense* and the BCCP using a proteomic approach. We also showed that the *E. coli* P_{II} protein GlnK formed a stable complex with BCCP *in vitro*. These results, together with the previous identification of the P_{II} -BCCP interaction in the chloroplast of *A. thaliana*, led us to propose that the P_{II} -BCCP interaction appeared in a deep-branching prokaryote ancestor before the origin of the chloroplast (Rodrigues *et al.*, 2014). However, in marked contrast to the results obtained in *A. thaliana*, the presence of GlnK did not affect the activity of purified *E. coli* ACC *in vitro* (Rodrigues *et al.*, 2014). In *E. coli*, another P_{II} like protein named GlnB is present. GlnB is constitutively expressed while GlnK is induced under nitrogen starvation (Liu and Magasanik, 1993; van Heeswijk *et al.*, 1996). GlnB and GlnK are very similar in structure and share 67% amino acid identity (Xu *et al.*, 1998). Here we show that GlnB, but not GlnK, can form a ternary complex with the BC-BCCP components of ACC and that this interaction results in ACC inhibition by decreasing the enzyme turnover number. Both the BC-BCCP-GlnB interaction and ACC inhibition were relieved by 2-OG and by GlnB uridylylation.

Results

E. coli GlnB but not GlnK can bind to the BC-BCCP complex

In a previous study, we showed that the *E. coli* GlnK protein interacts with biotinylated BCCP *in vitro* in the presence of MgATP but strikingly GlnK had no effect on the ACC activity (Rodrigues *et al.*, 2014).

The BC and BCCP components of the *E. coli* ACC enzyme are known to form a stable complex (Choi-Rhee and Cronan, 2003; Broussard *et al.*, 2013a,b). Therefore, it is reasonable to assume that the physiologically relevant form of BCCP will be found as a BC-BCCP complex within the cell. We thought that if the GlnK-BCCP interaction would function to regulate the ACC activity, GlnK should be able to bind to the BC-BCCP complex.

We assessed whether GlnK could bind the BC-BCCP complex by co-purification using Ni^{2+} beads. His-tagged

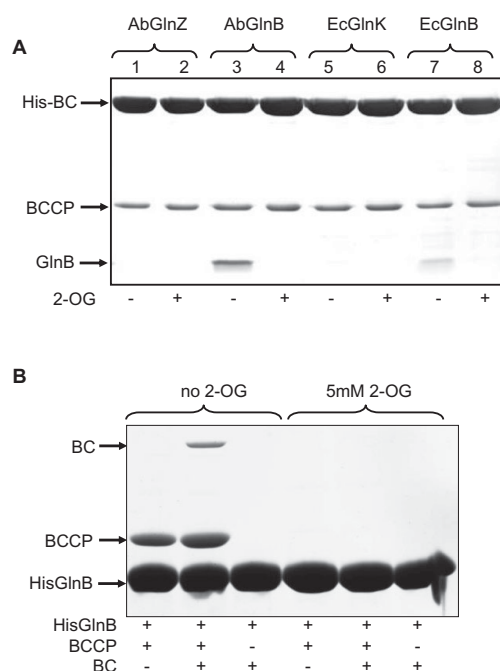


Fig. 2. Formation of the BC-BCCP-GlnB complex.

A. Complex formation between His-BC, BCCP and P_{II} proteins was assessed by pull-down under saturating ATP (3.5 mM), 5 mM of MgCl₂ and 2 mM of 2-OG as indicated. Purified His-BC was mixed with biotinylated BCCP and with the indicated P_{II} protein from *A. brasilense* (Ab) or *E. coli* (Ec). Proteins eluted from the Ni²⁺ beads were analyzed by SDS-PAGE and the gel was stained with Coomassie Blue.

B. Complex formation between Ec His-GlnB, BCCP and BC was assessed by pull-down under saturating ATP (3.5 mM), with 5 mM of MgCl₂ and 5 mM of 2-OG added as indicated.

BC was mixed with biotinylated BCCP together with the *E. coli* GlnK in the presence of MgATP. After extensive washes, the proteins were eluted with imidazole and analyzed by SDS-PAGE (Fig. 2A). No signal of GlnK was detected in the elution (Fig. 2A, lane 5). This result confirmed that even though GlnK can interact with free BCCP (Rodrigues *et al.*, 2014), it cannot bind to the physiological relevant form of BCCP, namely the BC-BCCP complex (Fig. 2A). This offers an explanation as to why GlnK failed to affect ACC activity *in vitro* (Rodrigues *et al.*, 2014).

Interestingly, when the co-purification experiments were performed substituting GlnK for its paralogous protein GlnB, GlnB was co-purified with the BC-BCCP complex (Fig. 2A, lane 7). These results were confirmed using the reverse approach. When HisGlnB was immobilized on the Ni²⁺ beads, BC and BCCP co-purified with GlnB (Fig. 2B, lane 2).

As expected, based on previous data (Rodrigues *et al.*, 2014), BCCP alone co-purified with HisGlnB (Fig. 2B, lane 1), while BC alone did not co-purify with HisGlnB (Fig. 2B, lane 3). These results support a model where GlnB can interact with the physiological relevant form of BCCP through the formation of a BC-BCCP-GlnB ternary protein complex where BCCP bridges the GlnB-BC interaction.

Azospirillum brasilense GlnB but not GlnZ can bind to the *E. coli* BC-BCCP complex

We reported previously that the *E. coli* BCCP is able to interact with the two orthologous P_{II} proteins (GlnB and GlnZ) from the α -Proteobacterium *A. brasilense* (Rodrigues *et al.*, 2014). We therefore evaluated whether the *E. coli* BC-BCCP complex would be able to discriminate between *A. brasilense* GlnB and GlnZ. The results obtained using the *A. brasilense* P_{II} proteins paralleled the data obtained with the *E. coli* P_{II} proteins. *A. brasilense* GlnB was able to bind the *E. coli* BC-BCCP complex (Fig. 2A, lane 3) while GlnZ, which is the *E. coli* GlnK ortholog, failed to do so (Fig. 2A, lane 1). These results support the view that GlnB is the only type of P_{II} protein that is able to bind to the BC-BCCP complex.

The signal of *A. brasilense* GlnB that co-purified with the *E. coli* BC-BCCP complex was stronger than the signal obtained using *E. coli* GlnB (Fig. 2A, compare the GlnB signal between lanes 3 and 7). This effect was highly reproducible under different buffer conditions and suggests that *A. brasilense* GlnB interacts more avidly with the *E. coli* BC-BCCP complex than does *E. coli* GlnB.

Co-purification of either *E. coli* or *A. brasilense* GlnB with the BC-BCCP complex did not occur in the presence of MgATP when combined with high 2-OG levels (Fig. 2A and B). Under saturating ATP (3.5 mM), the formation of the BC-BCCP-GlnB ternary complex was negatively affected by increasing the 2-OG levels within the physiological range (Fig. 3A). The complex was stable in the presence of up to 0.1 mM 2-OG; at 0.5 mM it was barely detectable, and became undetectable at 1 mM 2-OG (Fig. 3A). Other α -keto-acids, such as oxaloacetate and pyruvate, did not affect BC-BCCP-GlnB complex formation (Fig. 3B and C). Varying the ATP/ADP ratio under physiological relevant conditions also did not significantly affect the formation of the BC-BCCP-GlnB complex (Fig. S1). Hence, 2-OG levels, rather than the cellular energy charge, seem to be the major signal controlling the formation of the BC-BCCP-GlnB complex.

GlnB inhibits the ACC activity *in vitro* in a 2-oxoglutarate-dependent manner

The protein-protein interaction assays led us to hypothesize that GlnB could act as a regulator of ACC activity. To

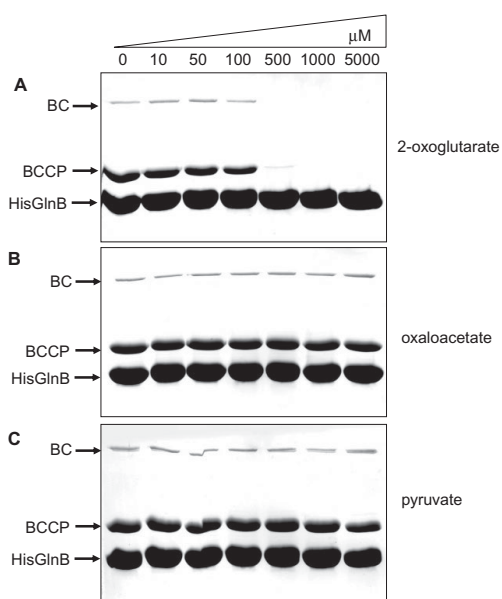


Fig. 3. Formation of the BC-BCCP-GlnB complex is specifically inhibited by 2-oxoglutarate. Complex formation between Ec His-GlnB, BCCP and BC was assessed by pull-down with saturating ATP (3.5 mM), 5 mM of $MgCl_2$ and in the presence of the indicated concentrations of (A) 2-oxoglutarate, (B) oxaloacetate or (C) pyruvate.

test this hypothesis, an LC/MS approach was used which allows the quantification of malonyl-CoA, the final product of ACC. In the presence of *E. coli* GlnB, the ACC activity decreased about ~45% in comparison with the control (Fig. 4A).

In order to confirm these results, a coupled enzyme assay was used, which allows quantification of the ADP produced by ACC in real time following NADH oxidation (Broussard *et al.*, 2013b). This assay showed ~40% inhibition of ACC in the presence of *E. coli* GlnB and ~70% inhibition in the presence of *A. brasilense* GlnB (Fig. 4B). By contrast, the presence of *E. coli* GlnK or *A. brasilense* GlnZ had no effect on ACC activity (Fig. 4B).

GlnB-dependent ACC inhibition was dose dependent. Augmenting the concentration of *E. coli* or *A. brasilense* GlnB in the assay increased ACC inhibition (Fig. 4C). The maximum calculated inhibition was 56% with IC_{50} 0.93 μM and 90% with IC_{50} 0.43 μM , for *E. coli* and *A. brasilense* GlnB respectively. The lower IC_{50} reinforces that the *A. brasilense* GlnB binds to the BC-BCCP complex more avidly than *E. coli* GlnB.

The level of ACC inhibition by P_{II} (Fig. 4B) paralleled the apparent affinity between each P_{II} protein and the

BC-BCCP complex. *A. brasilense* GlnB, which showed the higher apparent affinity for the *E. coli* BC-BCCP complex (Figs 2A and 4C) inhibited ACC by ~70%. The *E. coli* GlnB protein, which showed a moderate affinity for the BC-BCCP complex, inhibited ACC by ~40%. The *E. coli* GlnK and *A. brasilense* GlnZ proteins, which showed no detectable interaction with BC-BCCP, had no effect on ACC activity (Fig. 4B).

Inhibition of the ACC activity by GlnB was completely reversed by increasing the 2-OG levels to 1 mM (Fig. S2).

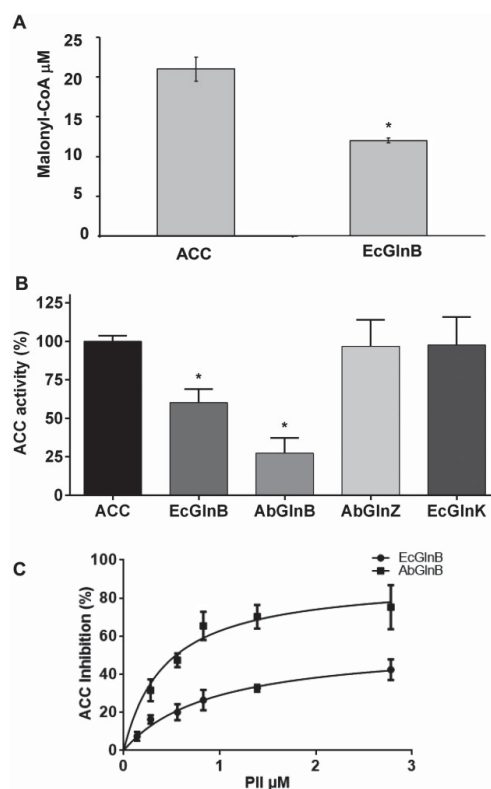


Fig. 4. The effects of different P_{II} proteins on *E. coli* ACC activity. A. The activity of ACC was monitored by determining the amount of malonyl-CoA produced by LC/MS in the presence of BSA (ACC) or *E. coli* GlnB (EcGlnB). B. The activity of ACC was measured using the coupled enzyme assay in the presence or absence of the indicated P_{II} proteins. The results are plotted as a % of the control reaction without P_{II} proteins. C. ACC activity determined by the coupled assay in the presence of increasing concentration of EcGlnB. Data are reported as the average of duplicate (LC/MS) or triplicate (coupled assay) experiments \pm standard deviation. Statistical analysis was performed with *t*-test at $p < 0.05$. The asterisk indicates significant difference between the sample and control (ACC).

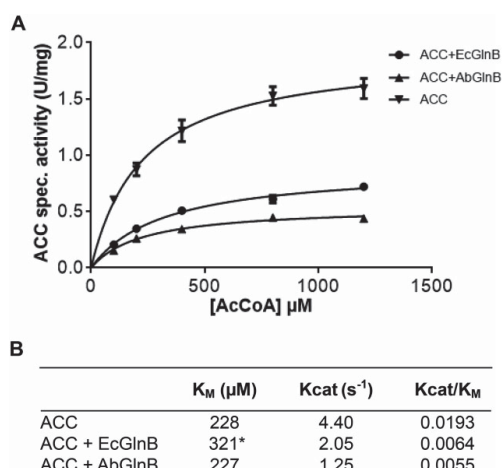


Fig. 5. Effects of GlnB on the kinetic parameters of ACC. A. Coupled ACC assays were performed in the presence of increasing acetyl-CoA concentrations in the presence of 1.4 μM of AbGlnB or EcGlnB as indicated. The assays were performed in duplicate and standard deviations are indicated by error bars. B. The K_M and the K_{cat} values were determined by fitting the data into Michaelis–Menten equation using the GraphPad Prism software. Statistical analysis was performed with t -test at $p < 0.05$. The asterisk indicates significant difference between the sample and control (ACC).

This result is in agreement with the co-purification analysis, which showed that GlnB does not interact with the BC-BCCP complex at 1 mM 2-OG (Fig. 3A). We conclude that, as the 2-OG binding sites on GlnB are occupied by increasing the 2-OG levels, there is a reduction in the affinity between GlnB and ACC, thereby relieving the GlnB-dependent inhibition of ACC.

To determine the mechanism by which GlnB affects the ACC activity, kinetic studies were performed (Fig. 5). The determined K_M for acetyl-CoA (228 μM , Fig. 5) is within the same range as determined for other bacterial ACC enzymes deposited in the Brenda database (Schomburg *et al.*, 2013). In the presence of *E. coli* GlnB, the K_M for acetyl-CoA increased slightly (from 228 to 321 μM) while the K_{cat} was reduced by more than half (Fig. 5). When *A. brasilense* GlnB was added to the assay, the K_M for acetyl-CoA remained unaltered while the K_{cat} decreased by a factor of 3 (Fig. 5). These data support the view that the major effect of GlnB is to reduce the ACC turnover number.

Uridylylated GlnB does not affect ACC activity

In addition to allosteric regulation, the activity of P_{II} in Proteobacteria is controlled by reversible uridylylation of the P_{II} T-loop. Under nitrogen-limiting conditions, GlnB is

observed to be fully uridylylated (Maheswaran and Forchhammer, 2003; Huergo *et al.*, 2006). We assessed whether GlnB-UMP₃ could bind to the immobilized HisBC-BCCP complex by co-purification using Ni²⁺ beads. The results showed that GlnB-UMP₃ did not co-purify with the BC-BCCP complex in contrast to non-uridylylated GlnB (Fig. S3). Hence, the formation of the BC-BCCP-GlnB complex is inhibited when GlnB is uridylylated and, as expected, GlnB-UMP₃ failed to alter ACC activity (Figs 6 and S3).

Role of the P_{II} T-loop on P_{II} -BCCP-BC complex formation

Given that GlnB uridylylation abrogated its ability to interact with BC-BCCP (Fig. S3A), we suspected that the P_{II} T-loop would be important for this interaction. Indeed, an AbGlnB variant carrying a partial deletion on the T-loop (AbGlnB Δ Tloop, Δ 42–54) failed to interact with BC-BCCP (Fig. 7C) and to reduce ACC activity *in vitro* (Fig. 7B). We will show elsewhere that the deletion of the P_{II} – T-loop did not affect the overall P_{II} structure or the mode of nucleotide binding (V.R. Moure *et al.*, unpubl.).

AbGlnB is 66% identical and 81% similar to AbGlnZ (Fig. 7A); however, only the former was able to interact with BC-BCCP (Fig. 2). We suspected that small structural differences in the T-loops of these proteins would be responsible for the selectivity toward GlnB. To address this hypothesis, we used variants of AbGlnB or AbGlnZ where the major divergent residues found in the T-loop of one protein were exchanged by the residues found in the other. Surprisingly, the AbGlnB V52S-D54S acted similarly to wild-type AbGlnB in regard to interaction and ACC regulation (Fig. 7). Furthermore, changing the T-loop resi-

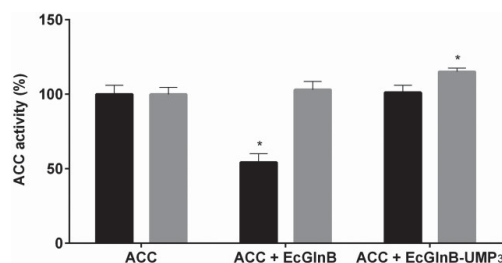


Fig. 6. Effects of GlnB uridylylation on the *E. coli* ACC activity. The activity of ACC was measured by the coupled enzyme assay in the presence 1.4 μM *E. coli* GlnB (EcGlnB) or fully uridylylated *E. coli* GlnB (EcGlnB-UMP₃). Results are plotted as a % of the control reaction without GlnB. Black bars, experiments performed without 2-OG. Gray bars, experiments performed in the presence of 2-OG 1 mM. Data are reported as the average of triplicate experiments \pm standard deviation. Statistical analysis was performed with t -test at $p < 0.05$. The asterisks indicate significant difference between the sample and control (ACC).

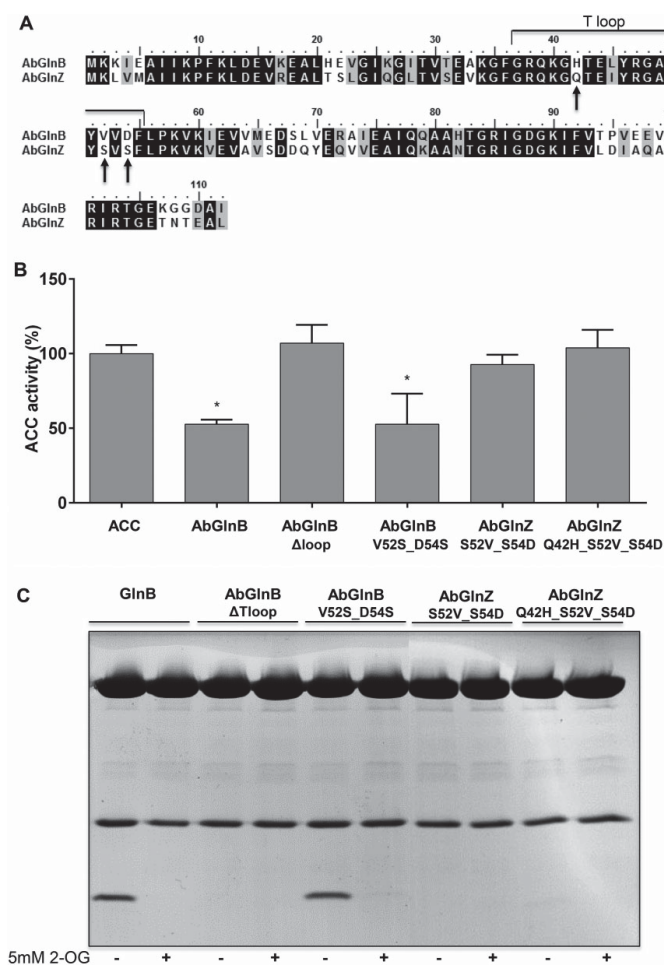


Fig. 7. Effects of AbGlnB and AbGlnZ variants on *E. coli* ACC activity and complex formation.

A. Alignment of AbGlnB and AbGlnZ. Different residues in the T loop region are indicated by an arrow.

B. The activity of ACC was measured by the coupled enzyme assay in the absence or presence of 1 μ M of the indicated P_{II} protein. Results are plotted in % of the control (reaction without P_{II}). Data are reported as the average of triplicate experiments \pm standard deviation. The asterisks indicate significant difference to control ($p < 0.05$).

C. Complex formation between His-BC, BCCP and the indicated P_{II} protein was assessed by pull-down under saturating ATP (3.5 mM), 5 mM of $MgCl_2$, and in the absence or presence of 5 mM 2-oxoglutarate, as indicated.

dues on AbGlnZ to those found on AbGlnB (AbGlnZ S52V-S54D and AbGlnZ Q42H-S52V-S54D) resulted in proteins that had AbGlnZ phenotypes (Fig. 7).

These results suggest that even though the P_{II} T-loop is required for interaction with BCCP-BC, it is not the major determinant for the specificity of this complex toward GlnB.

Discussion

We showed previously that even though BCCP interacts with the GlnK protein, the formation of this complex does not affect ACC activity *in vitro* (Rodrigues *et al.*, 2014). In the present work, we provide an explanation for that result. We observed that although GlnK can interact with free BCCP (Rodrigues *et al.*, 2014), it is not able to inter-

act with the physiological relevant form of BCCP observed *in vivo* as a BC-BCCP complex (Fig. 2A). On the other hand, the GlnB protein can interact with the BC-BCCP complex (Fig. 2) and negatively affect ACC activity in a GlnB dose-dependent manner (Fig. 4).

The ability of GlnB to bind the BC-BCCP complex and to inhibit ACC was negatively influenced by the levels of 2-OG and by GlnB uridylation. Both 2-OG binding and uridylation affect the structure of the P_{II} T-loop (Truan *et al.*, 2010). Hence, it is reasonable to assume that the T-loop is an important docking site for complex formation between GlnB and BC-BCCP. A hypothesis that was confirmed by experiments using a variant of GlnB where carrying a deletion of the T-loop, this variant failed to interact and regulate ACC activity (Fig. 7).

We showed previously that the binding of P_{II} to BCCP requires the biotinylation of BCCP (Rodrigues *et al.*, 2014). In the structure of the BC-BCCP complex, the site of biotinylation (BCCP K122) is solvent exposed (Fig. S4) (Broussard *et al.*, 2013a). We hypothesize that the biotinylated region of BCCP interacts with the GlnB T-loop affecting the ability of BCCP to act as a swinging arm, transporting carboxylated biotin between BC and CT. This hypothesis is corroborated by the kinetic analysis, which showed that GlnB acts to reduce the ACC turnover number (Fig. 5) but not the affinity toward acetyl-CoA.

The present study suggests that ACC activity seems to be under dual control, feedback-inhibited by the end-product and fine-tuned by the global carbon-status via PII. As already known, over-accumulation of acyl-ACP levels leads to feedback inhibition of ACC activity (Davis and Cronan, 2001). In addition, our data support the proposition that GlnB contributes to the regulation of the committed step in fatty acid biosynthesis by acting as a dissociable regulatory subunit of ACC in response to the metabolic status reporter 2-OG (see below). The regulation of the multi-subunit forms of ACC by P_{II} is likely to be conserved throughout nature as it has been reported in distantly related organisms such as *A. thaliana* (Feria Bourrellier *et al.*, 2010), *E. coli* and *A. brasiliense* (this work). In this report, the negative regulatory effect of P_{II} on ACC activity was proven using purified components.

In *E. coli*, the rate of fatty acid biosynthesis increases with nutrient availability; however, the underlying mechanism is unknown (Yao *et al.*, 2012). The only fate of the malonyl-CoA produced by *E. coli* ACC is to act as a precursor for fatty acids biosynthesis in order to drive lipid biosynthesis (Cronan and Waldrop, 2002). Our data support the hypothesis that 2-OG levels act as a proxy to determine the rate of membrane biogenesis and thus cell growth. 2-OG is used as the carbon skeleton for nitrogen assimilation and as an intermediate of the TCA cycle, and as such 2-OG levels reflect the nitrogen/carbon balance (van Heeswijk *et al.*, 2013). Indeed, recent studies proposed that 2-OG acts as a global regulatory metabolite in *E. coli* (Rabinowitz and Silhavy, 2013; Schumacher *et al.*, 2013).

When *E. coli* is carbon starved, the 2-OG levels drop significantly and rapidly (Yan *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013). This reduction in 2-OG would allow GlnB to inhibit ACC, reducing the rate of malonyl-CoA production and thus membrane biogenesis (Fig. 8B). Conversely, when carbon is abundant, the high 2-OG levels would relieve the GlnB-dependent ACC inhibition, allowing fatty acid biosynthesis to occur at higher rates (Fig. 8C). This hypothesis is in agreement with a recent report showing that 2-OG levels coordinate cyclic-AMP production switching *E. coli* metabolism from catabolic to anabolic in

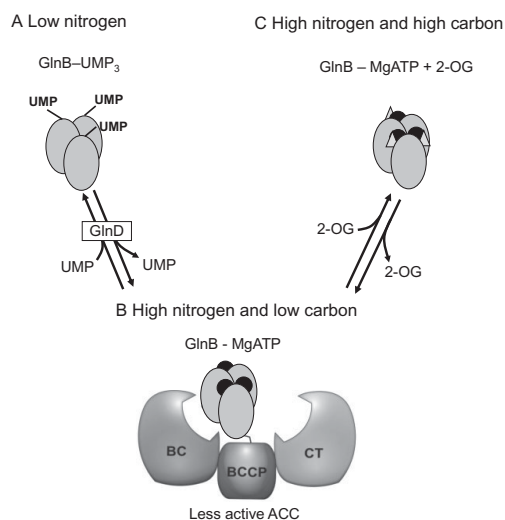


Fig. 8. Model for ACC regulation by GlnB.

A. When nitrogen is limited, the intracellular levels of 2-OG are high and glutamine is low. GlnB is fully uridylylated and does not interact with BCCP, allowing full ACC activity.

B. When ammonium becomes available, glutamine rises and 2-OG drops, GlnB is de-uridylylated (reaction catalyzed by the GlnD enzyme in response to high glutamine) and bound to MgATP (black dots). Under this condition, GlnB interacts with BCCP, thereby reducing ACC activity.

C. If the 2-OG levels increase under a high nitrogen regime, 2-OG binds to GlnB (light gray triangles), promoting its dissociation from ACC, thereby activating ACC.

response to increased 2-OG levels (Rabinowitz and Silhavy, 2013; You *et al.*, 2013).

The 2-OG levels are also influenced by the nitrogen availability; under nitrogen starvation, 2-OG accumulates while glutamine levels are reduced (Yuan *et al.*, 2009; Radchenko *et al.*, 2010; Schumacher *et al.*, 2013). This condition favors P_{II} protein uridylylation and GlnB is converted to GlnB-UMP₃ (Jiang *et al.*, 1998). Our data indicate that GlnB-UMP₃ does not interact with BC-BCCP and does not inhibit ACC (Figs 6 and S3). Hence, GlnB will only inhibit ACC when nitrogen is abundant (GlnB is not uridylylated) and when carbon is low (GlnB is not bound to 2-OG) (Fig. 8B). To our knowledge, this is the first report showing regulation of a carbon-dedicated pathway by P_{II} in Bacteria.

The results of this study add an important detail to the mode of regulation of one of the most fundamental biochemical pathways in nature. They extend P_{II} protein function beyond nitrogen regulation in bacteria and may help to design engineered strains for biotechnological applications. For instance, fatty acids produced by *E. coli* have been explored as a source of a wide range of commercial products such as biofuels, including gasoline (Schirmer

Table 1. Bacterial strains and plasmids.

Strain/plasmid	Genotype/phenotype	Source/Reference
<i>E. coli</i>		
DH10B	Sm ^r ; F' [<i>proAB</i> ⁺ <i>lacZ</i> M15]	Invitrogen
ET8000	<i>rbs lacZ::IS1 gyrA hutC_k</i>	Macneil, 1981
BL21 (DE3)	Expresses T7 RNA polymerase	Agilent
Plasmids		
pET28a	Km ^r . Expression vector T7 promoter	Novagen
pET29a	Km ^r . Expression vector T7 promoter	Novagen
pMSA4	Km ^r (pET28a). Expresses <i>A. brasilense</i> GlnZ	Moure <i>et al.</i> , 2012
pLH25PET	Km ^r (pET28a). Expresses <i>A. brasilense</i> GlnB	Huergo <i>et al.</i> , 2005
pET16b <i>accAD</i>	Amp ^r (pET16b). Expresses <i>E. coli accAD</i> with a His tag at N-terminal of AccA	Soriano <i>et al.</i> , 2006
pET16b <i>accC</i>	Amp ^r (pET16b). Expresses <i>E. coli accC</i> with a His tag at N-terminal of AccC	Soriano <i>et al.</i> , 2006
pCY216	Cm ^r . Expresses <i>E. coli</i> BirA, biotin ligase protein from the <i>araBAD</i> promoter.	Chapman-Smith <i>et al.</i> , 1994
pJT25	Amp ^r (pT7-7). Expresses <i>E. coli</i> GlnK	Radchenko <i>et al.</i> , 2010
pTRPETHisGlnK	Km ^r (pET28a). Expresses <i>E. coli</i> GlnK carrying a 6 × His tag at N-terminal	Rodrigues <i>et al.</i> , 2014
pTRPETBCCPn	Km ^r (pET29a). Expresses <i>E. coli</i> BCCP	Rodrigues <i>et al.</i> , 2014
pTRPETGlnB	Km ^r (pET29a). Expresses <i>E. coli</i> GlnB	This work
pTRPETHisGlnB	Km ^r (pET28a). Expresses <i>E. coli</i> GlnB carrying a 6 × His tag at N-terminal	This work
pTRPETBC	Km ^r (pET29a). Expresses <i>E. coli</i> BC	This work
pMSA4 Q42HS52VS54D	Km ^r (pET28a). Expresses <i>A. brasilense</i> GlnZ variant Q42H_S52V_S54D	Moure <i>et al.</i> , 2013
pMSA4 S52VS54D	Km ^r (pET28a). Expresses <i>A. brasilense</i> GlnZ variant S52V_S54D	Moure <i>et al.</i> , 2013
pGlnB Δ42–54	Km ^r (pET28a) Expresses <i>A. brasilense</i> GlnB carrying a T-loop deletion	Moure <i>et al.</i> , 2013
pET28aGlnBAbV52SD54S	Km ^r (pET28a) Expresses <i>A. brasilense</i> GlnB variant V52S_D54S	This work

et al., 2010; Bokinsky *et al.*, 2011; Lennen and Pfleger, 2012; Choi and Lee, 2013; Howard *et al.*, 2013; Huerlimann and Heimann, 2013). The major limitation for the industrial production of *E. coli*-derived biofuels is the poor yield (Lennen and Pfleger, 2012), and hence identification of GlnB as the negative regulator of the rate-limiting step in fatty acid biosynthesis may help to improve biofuel production by bacteria.

Experimental procedures

Bacterial strains and growth conditions

The bacterial strains and plasmids used are listed in Table 1.

Cloning and molecular biology methods

Isolation of plasmid DNA, gel electrophoresis, bacterial transformation and cloning were performed as described (Sambrook *et al.*, 1989). Enzymes were obtained from commercial sources and used according to the manufacturers' instructions. DNA sequencing was performed using dye-labeled terminators (ET terminator – GE healthcare) in an automated DNA sequencer ABI 3500 from Applied Biosystems.

The plasmid pTRPETGlnB that encodes the non-tagged *E. coli* GlnB was obtained by PCR-amplification of the *glnB* gene using *E. coli* ET8000 genomic DNA as template and the primers 5' GGAATCATATGAAAAAGATTGATGCG 3' (*NdeI* restriction site underline) and 5' CTTGAGGATCCTTAAATTGCGCGTCGTCC 3' (*Bam*HI restriction site underline). The PCR product was digested with *NdeI* and

*Bam*HI and ligated into the pET29a vector previously digested with the same enzymes. The resulting plasmid pTRPETGlnB was sequenced to check its integrity. The pTRPETHisGlnB plasmid was obtained by subcloning the *NdeI*-*Bam*HI *glnB* gene from pTRPETGlnB into the pET28a vector. The pTRPETBC plasmid was obtained by PCR-amplification of the *accC* gene using *E. coli* ET8000 genomic DNA as template and the primers 5' GGAATCATATGCTGGATAAAATTGTTATTGC 3' (*NdeI* restriction site underline) and 5' CTTGAGGATCCTTATTTTCTCTGAA-GACCGAG 3' (*Bam*HI restriction site underline). The PCR product was digested with *NdeI* and *Bam*HI and ligated into the pET29a vector previously digested with the same enzymes.

The pET28aGlnBAbV52SD54S plasmid was obtained from pLH25PET using the QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent) and the following oligonucleotide 5'-GTACCGCGGCGCGGAGTATTCGGTCAGCTTCCTGCCGAAG-3'. The mutation was verified by DNA sequencing.

Protein analysis

Electrophoresis of proteins was carried out by SDS-PAGE and gels were Coomassie stained. Protein concentrations were determined by the Bradford assay using bovine serum albumin as standard.

Protein expression and purification

E. coli BL21 (DE3) cells carrying the expression plasmids of interest (Table 1) were cultivated on 400 ml LB at 37°C

to an OD₆₀₀ of 0.5. IPTG 0.5 mM was added; after 3 hours, cells were harvested by centrifugation. The pellet was resuspended in 20 ml of 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 M KCl, 20% glycerol. Cells were disrupted by sonication; cell extracts were clarified by centrifugation (30 000 × g for 15 minutes at 4°C). The purification of His tagged proteins (*E. coli* HisBC, HisCT and HisGlnB), native proteins EcGlnK, AbGlnZ, AbGlnB, AbGlnB and AbGlnZ variants and biotinylated BCCP was performed as described previously (Moure *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2014). MALDI-TOF mass spectrometry analysis indicated that the BCCP used in this study was completely biotinylated.

The purification of native *E. coli* GlnB was performed using 1 ml Hi-Trap DEAE sepharose column (GE Healthcare) previously equilibrated with buffer A (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 M KCl, 20% glycerol). Proteins were eluted with a linear gradient up to 1 M KCl in buffer A. Fractions containing GlnB were pooled and loaded onto a Superpose 6 10/300 gel filtration column (GE Healthcare) equilibrated with 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 M KCl. Protein fractions were analyzed by SDS-PAGE, and the fractions containing the protein of interest were dialyzed in Tris-HCl pH 7.5, 0.1 M KCl, 20% glycerol. Typical protein preparations were more than 95% pure as judged by SDS-PAGE analysis. Proteins were stored in small aliquots at -20°C.

For the purification of native *E. coli* BC, cell extracts expressing the BC protein were loaded onto a 1 ml heparin column (GE Healthcare) pre-equilibrated with 50 mM TrisHCl pH 7.5. BC eluted in the flow-through, which was successively, loaded onto a 1 ml DEAE followed by a 1 ml Q-sepharose column (GE Healthcare) using the same buffer. The BC that eluted in the flow-through was partially pure; this preparation was used as the source of untagged BC that was used in the pull-down assays.

The uridylylated P_{II} proteins were obtained as described using the *Herbaspirillum seropedicae* GlnD enzyme (Bonatto *et al.*, 2012). The degree of uridylylation was checked by native PAGE analysis or by MALDI-TOF mass spectrometry.

Protein co-precipitation using magnetic beads

In vitro complex formation was performed using HisMagnetic beads (Promega) as described (Huergo *et al.*, 2007). All reactions were conducted in buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 8, 0.1 M NaCl, 0.1% (w/v) Lauryldimethylamine oxide (LDAO), 10% glycerol, 20 mM imidazole in the presence or absence of effectors as indicated in each experiment. Five µl of beads was equilibrated by wash with 100 µl of buffer. For ternary complex formation, the binding reactions were performed in 500 µl of buffer by adding purified proteins: 20 µg HisBC, 15 µg BCCP and 20 µg of

the different P_{II} proteins. Alternatively, when HisGlnB was used as bait, the proteins used were: 5 µg HisGlnB, 15 µg BCCP and 20 µg BC. The proteins were mixed and kept at room temperature; after 20 minutes, the beads were washed 3 times with 300 µl of buffer. Elution was performed incubating the beads with 20 µl of buffer containing 0.5 M imidazole for 5 minutes. Eluted samples were mixed with sample buffer and analyzed in 15% SDS-PAGE stained with Coomassie blue.

In vitro activity of ACC by LC/MS

The activity of ACC was monitored by quantitative LC/MS following a similar strategy to that described previously (Rodrigues *et al.*, 2014). The purified *E. coli* ACC components were mixed to a final concentration of 120 nM (monomer of each ACC subunit) in 0.5 ml of assay buffer (50 mM HEPES pH 8; 5 mM HCO₃⁻; 5 mM MgCl₂; 3.5 mM ATP and 1 mM DTT). Reactions were equilibrated at 25°C and initiated by the addition of 0.2 mM acetyl-CoA. Samples of 40 µl were removed after 10 minutes and mixed with 10 µl of ice-cold acetic acid 50% (v/v) to quench the reaction. 3-¹³C malonyl-CoA (15 µM; Sigma) was spiked into each sample to be used as internal standard. Samples were centrifuged at 20 000 × g, 5 minutes at 4°C, and 10 µl of the supernatant was used for LC/MS analysis.

Metabolites were separated using a UFLC Prominence (Shimadzu) in a C18 column 2.6 µm 50 × 2.1 mm (Phenomenex) kept at 40°C. The mobile phases were composed of 15 mM acetic acid and 10 mM tributylamine (solvent A) or methanol (solvent B). Samples were placed into vials and kept in an auto sampler at 4°C; 10 µl of each sample was injected at 0.2 ml min⁻¹ in duplicate. Metabolites were eluted from the column using a linear gradient (25 to 100% of solvent B) in 20 minutes. The column was allowed to equilibrate for 10 minutes in solvent A before each run.

The detection of the metabolites was performed by coupling the LC with a MicroQTOF-QII (Bruker Daltonics) operating on a negative mode. The LC/MS apparatus was calibrated with malonyl-CoA standards at 5, 10, 25, 35, 50, 75 and 100 µM. This allowed the determination retention time (RT) and the dynamic range of malonyl-CoA detection which was linear with R² > 0.99. The quantification of malonyl-CoA was performed by correlating the height of the unlabeled malonyl-CoA peak against the height of the 3-¹³C malonyl-CoA internal standard peak.

In vitro activity of ACC by coupled enzyme assay

ACC activity was measured by coupling the ACC catalyzed ATP hydrolysis to the activities of pyruvate kinase (PK) and lactate dehydrogenase (LDH) as described (Beez *et al.*, 2009; Broussard *et al.*, 2013b), with a few modifications.

The reaction buffer consisted of 50 mM imidazole, 50 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 0.2 mM NADH, 1 mM phosphoenolpyruvate, 10 mM ATP, 0.5 mM DTT, 4.4 units of LDH, 6 units PK and 10 mM NaHCO₃. The reactions contained 10 nM CT (tetramer concentration), 20 nM BC (dimer concentration) and 200 nM BCCP (monomer concentration). The pH of the final reaction mixture was 7.5 and the final volume was 400 µl. Different concentrations of P_{II} and 2-OG were used as indicated in the figures.

The reactions were pre-incubated for 15 minutes at 25°C and started by the addition of acetyl-CoA 400 µM (unless stated otherwise). The oxidation of NADH to NAD⁺ was recorded at 25°C over a period of 20 min in a SPECORD 200 photometer (Analytik Jena) at a wavelength of 340 nm. From the slope of decreasing absorption, reaction velocity was calculated with an extinction coefficient for NADH of 6220 M⁻¹. For the determination of catalytic constants, the data were fitted to Michaelis–Menten equation using GraphPad Prism software. The ACC K_{cat} was calculated using the number of the CT tetramers in the reactions.

Kolmogorov–Smirnov test demonstrated the normal distribution of coupled assays data, thus parametric statistics could be applied. Data were analyzed using parametric paired *t*-tests (GraphPad Prism 6.0). Probabilities of < 0.05 were accepted as significant.

Acknowledgements

We are grateful to Anne Chapman-Smith (University of Adelaide), Mike Merrick (John Innes Centre) and Aileen Soriano (Schering-Plough Research Institute) for providing the plasmids used in this study. We thank Maria Isabel Stets for the construction of the pET28aGlnBAbV52SD54S plasmid. We are also grateful to Mike Merrick and Ray Dixon (John Innes Centre) for critical reading of the manuscript. This work was supported by CNPq, Fundação Araucária, CAPES and CNPq-INCT, and by DFG grant Fo195/9.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Araujo, L.M., Huergo, L.F., Invitti, A.L., Gimenes, C.I., Bonatto, A.C., Monteiro, R.A., *et al.* (2008) Different responses of the GlnB and GlnZ proteins upon *in vitro* uridylation by the *Azospirillum brasilense* GlnD protein. *Braz J Med Biol Res* **41**: 289–294.
- Beez, S., Fokina, O., Herrmann, C., and Forchhammer, K. (2009) N-acetyl-L-glutamate kinase (NAGK) from oxygenic phototrophs: P(II) signal transduction across domains of life reveals novel insights in NAGK control. *J Mol Biol* **389**: 748–758.
- Bokinsky, G., Peralta-Yahya, P.P., George, A., Holmes, B.M., Steen, E.J., Dietrich, J., *et al.* (2011) Synthesis of three advanced biofuels from ionic liquid-pretreated switchgrass using engineered *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 19949–19954.
- Bonatto, A.C., Souza, E.M., Oliveira, M.A., Monteiro, R.A., Chubatsu, L.S., Huergo, L.F., and Pedrosa, F.O. (2012) Uridylation of *Herbaspirillum seropedicae* GlnB and GlnK proteins is differentially affected by ATP, ADP and 2-oxoglutarate *in vitro*. *Arch Microbiol* **194**: 643–652.
- Broussard, T.C., Kobe, M.J., Pakhomova, S., Neau, D.B., Price, A.E., Champion, T.S., and Waldrop, G.L. (2013a) The three-dimensional structure of the biotin carboxylase-biotin carboxyl carrier protein complex of *E. coli* Acetyl-CoA carboxylase. *Structure* **21**: 650–657.
- Broussard, T.C., Price, A.E., Laborde, S.M., and Waldrop, G.L. (2013b) Complex formation and regulation of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. *Biochemistry* **52**: 3346–3357.
- Chapman-Smith, A., Turner, D.L., Cronan, J.E., Jr, Morris, T.W., and Wallace, J.C. (1994) Expression, biotinylation and purification of a biotin-domain peptide from the biotin carboxy carrier protein of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. *Biochem J* **302** (Part 3): 881–887.
- Choi, Y.J., and Lee, S.Y. (2013) Microbial production of short-chain alkanes. *Nature* **502**: 571–574.
- Choi-Rhee, E., and Cronan, J.E. (2003) The biotin carboxylase-biotin carboxyl carrier protein complex of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem* **278**: 30806–30812.
- Cronan, J.E., Jr, and Waldrop, G.L. (2002) Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases. *Prog Lipid Res* **41**: 407–435.
- Davis, M.S., and Cronan, J.E., Jr (2001) Inhibition of *Escherichia coli* acetyl coenzyme A carboxylase by acyl-acyl carrier protein. *J Bacteriol* **183**: 1499–1503.
- Feria Bourrellier, A.B., Valot, B., Guillot, A., Ambard-Bretteville, F., Vidal, J., and Hodges, M. (2010) Chloroplast acetyl-CoA carboxylase activity is 2-oxoglutarate-regulated by interaction of PII with the biotin carboxyl carrier subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 502–507.
- Forchhammer, K. (2008) P(II) signal transducers: novel functional and structural insights. *Trends Microbiol* **16**: 65–77.
- van Heeswijk, W.C., Hoving, S., Molenaar, D., Stegeman, B., Kahn, D., and Westerhoff, H.V. (1996) An alternative PII protein in the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **21**: 133–146.
- van Heeswijk, W.C., Westerhoff, H.V., and Booger, F.C. (2013) Nitrogen assimilation in *Escherichia coli*: putting molecular data into a systems perspective. *Microbiol Mol Biol Rev* **77**: 628–695.
- Howard, T.P., Middelhaufe, S., Moore, K., Edner, C., Kolak, D.M., Taylor, G.N., *et al.* (2013) Synthesis of customized petroleum-replica fuel molecules by targeted modification of free fatty acid pools in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: 7636–7641.
- Huergo, L.F., Filipaki, A., Chubatsu, L.S., Yates, M.G., Steffens, M.B., Pedrosa, F.O., and Souza, E.M. (2005) Effect of the over-expression of PII and PZ proteins on the nitrogenase activity of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Letters* **253** (1): 47–54.
- Huergo, L.F., Souza, E.M., Araujo, M.S., Pedrosa, F.O., Chubatsu, L.S., Steffens, M.B., and Merrick, M. (2006) ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase in *Azospirillum brasilense* is regulated by AmtB-dependent membrane sequestration of DraG. *Mol Microbiol* **59**: 326–337.

- Huergo, L.F., Merrick, M., Pedrosa, F.O., Chubatsu, L.S., Araujo, L.M., and Souza, E.M. (2007) Ternary complex formation between AmtB, GlnZ and the nitrogenase regulatory enzyme DraG reveals a novel facet of nitrogen regulation in bacteria. *Mol Microbiol* **66**: 1523–1535.
- Huergo, L.F., Chandra, G., and Merrick, M. (2013) P(II) signal transduction proteins: nitrogen regulation and beyond. *FEMS Microbiol Rev* **37**: 251–283.
- Huerlimann, R., and Heimann, K. (2013) Comprehensive guide to acetyl-carboxylases in algae. *Crit Rev Biotechnol* **33**: 49–65.
- Jiang, P., and Ninfa, A.J. (2007) *Escherichia coli* PII signal transduction protein controlling nitrogen assimilation acts as a sensor of adenylate energy charge in vitro. *Biochemistry* **46**: 12979–12996.
- Jiang, P., Peliska, J.A., and Ninfa, A.J. (1998) Enzymological characterization of the signal-transducing uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme (EC 2.7.7.59) of *Escherichia coli* and its interaction with the PII protein. *Biochemistry* **37**: 12782–12794.
- Lennen, R.M., and Pfleger, B.F. (2012) Engineering *Escherichia coli* to synthesize free fatty acids. *Trends Biotechnol* **30**: 659–667.
- Liu, J., and Magasanik, B. (1993) The *glnB* region of the *Escherichia coli* chromosome. *J Bacteriol* **175**: 7441–7449.
- Macneil, D. (1981) General method, using Mu-Mud1 dilyso-gens, to determine the direction of transcription of and generate deletions in the *glnA* region of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **146**: 260–268.
- Maheswaran, M., and Forchhammer, K. (2003) Carbon-source-dependent nitrogen regulation in *Escherichia coli* is mediated through glutamine-dependent GlnB signalling. *Microbiology* **149**: 2163–2172.
- Meades, G., Jr, Benson, B.K., Grove, A., and Waldrop, G.L. (2010) A tale of two functions: enzymatic activity and translational repression by carboxyltransferase. *Nucleic Acids Res* **38**: 1217–1227.
- Moure, V.R., Razzera, G., Araujo, L.M., Oliveira, M.A., Gerhardt, E.C., Muller-Santos, M., et al. (2012) Heat stability of Proteobacterial PII protein facilitate purification using a single chromatography step. *Protein Expr Purif* **81**: 83–88.
- Moure, V.R., Danyal, K., Yang, Z.Y., Wendroth, S., Müller-Santos, M., Pedrosa, F.O., et al. (2013) The nitrogenase regulatory enzyme dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase (DraT) is activated by direct interaction with the signal transduction protein GlnB. *J Bacteriol* **195**: 279–286.
- Ninfa, A.J., and Jiang, P. (2005) PII signal transduction proteins: sensors of alpha-ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism. *Curr Opin Microbiol* **8**: 168–173.
- Rabinowitz, J.D., and Silhavy, T.J. (2013) Systems biology: metabolite turns master regulator. *Nature* **500**: 283–284.
- Radchenko, M.V., Thornton, J., and Merrick, M. (2010) Control of AmtB-GlnK complex formation by intracellular levels of ATP, ADP, and 2-oxoglutarate. *J Biol Chem* **285**: 31037–31045.
- Rodrigues, T.E., Gerhardt, E.C., Oliveira, M.A., Chubatsu, L.S., Pedrosa, F.O., Souza, E.M., et al. (2014) Search for novel targets of the PII signal transduction protein in Bacteria identifies the BCCP component of acetyl-CoA carboxylase as a PII binding partner. *Mol Microbiol* **91**: 751–761.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schirmer, A., Rude, M.A., Li, X., Popova, E., and del Cardayre, S.B. (2010) Microbial biosynthesis of alkanes. *Science* **329**: 559–562.
- Schomburg, I., Chang, A., Placzek, S., Sohngen, C., Rother, M., Lang, M., et al. (2013) BRENDA in 2013: integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: new options and contents in BRENDA. *Nucleic Acids Res* **41**: D764–D772.
- Schumacher, J., Behrends, V., Pan, Z., Brown, D.R., Heydenreich, F., Lewis, M.R., et al. (2013) Nitrogen and carbon status are integrated at the transcriptional level by the nitrogen regulator NtrC in vivo. *mBio* **4**: e00881-13.
- Smith, A.C., and Cronan, J.E. (2014) Evidence against translational repression by the carboxyltransferase component of *Escherichia coli* acetyl coenzyme A carboxylase. *J Bacteriol* **196**: 3768–3775.
- Soriano, A., Radice, A.D., Heribitter, A.H., Langsdorf, E.F., Stafford, J.M., Chan, S., et al. (2006) *Escherichia coli* acetyl-coenzyme A carboxylase: characterization and development of a high-throughput assay. *Anal Biochem* **349**: 268–276.
- Tong, L. (2013) Structure and function of biotin-dependent carboxylases. *Cell Mol Life Sci* **70**: 863–891.
- Truan, D., Huergo, L.F., Chubatsu, L.S., Merrick, M., Li, X.D., and Winkler, F.K. (2010) A new P(II) protein structure identifies the 2-oxoglutarate binding site. *J Mol Biol* **400**: 531–539.
- Xu, Y., Cheah, E., Carr, P.D., van Heeswijk, W.C., Westerhoff, H.V., Vasudevan, S.G., and Ollis, D.L. (1998) GlnK, a PII-homologue: structure reveals ATP binding site and indicates how the T-loops may be involved in molecular recognition. *J Mol Biol* **282**: 149–165.
- Yan, D., Lenz, P., and Hwa, T. (2011) Overcoming fluctuation and leakage problems in the quantification of intracellular 2-oxoglutarate levels in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **77**: 6763–6771.
- Yao, Z., Davis, R.M., Kishony, R., Kahne, D., and Ruiz, N. (2012) Regulation of cell size in response to nutrient availability by fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: E2561–E2568.
- You, C., Okano, H., Hui, S., Zhang, Z., Kim, M., Gunderson, C.W., et al. (2013) Coordination of bacterial proteome with metabolism by cyclic AMP signalling. *Nature* **500**: 301–306.
- Yuan, J., Doucette, C.D., Fowler, W.U., Feng, X.J., Piazza, M., Rabitz, H.A., et al. (2009) Metabolomics-driven quantitative analysis of ammonia assimilation in *E. coli*. *Mol Syst Biol* **5**: 302.
- Zhang, C., Wei, Z.H., and Ye, B.C. (2013) Quantitative monitoring of 2-oxoglutarate in *Escherichia coli* cells by a fluorescence resonance energy transfer-based biosensor. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 8307–8316.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.